

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Medicina y Cirugía



**VALOR CLÍNICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE
ADN PLASMÁTICO DURANTE EL
PERIOPERATORIO EN EL CÁNCER DE COLON**

**TESIS DOCTORAL
JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ MASIÁ**

MADRID 2018

Directores

Dra. Dolores C. García-Olmo

Dr. Antonio S. Salinas Sánchez

A mi familia

*Considero más valiente al que conquista sus
deseos que al que conquista a sus enemigos,
ya que la victoria más dura es la victoria
sobre uno mismo. Aristóteles*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero destacar la labor de mis directores de tesis, la Dra. Dolores C. García Olmo y el Dr. Antonio Salinas Sánchez.

A Lola, agradezco enormemente tu paciencia, esfuerzo y dedicación. Desde que te conocí siendo apenas residente, y con el mal trago de experiencias pasadas hemos recorrido juntos un camino largo y lleno de dificultades, que gracias a ti he podido salvar sin quedarme en la cuneta. Gracias por haber mantenido siempre firme el objetivo y por haber sabido guiar el rumbo de este proyecto.

A Antonio, tu incorporación al trabajo ha sido clave en la culminación del trabajo. Conocía al médico, pero ahora puedo decir que he descubierto al compañero, amigo y persona que hay en ti. Gracias por tu sinceridad y objetividad, como también por el apoyo en los momentos finales, cuando las fuerzas flaquean y aparecen las dudas. Has estado siempre en todo lo que he necesitado, y has sabido escucharme y empujarme a terminar el proyecto.

Al Dr. Damián García Olmo, agradezco tu preocupación y esfuerzo en todas las trabas burocráticas y administrativas que han ido surgiendo a lo largo de este interminable camino. No olvidaré jamás tu generosidad y desinterés en el tramo final.

A María Granada Picazo, una excelente compañera en el laboratorio y cuya ayuda ha sido inestimable para llevar a buen puerto las técnicas de laboratorio. No olvidaré tu buena dedicación, enseñanzas y esfuerzo con una actitud siempre positiva.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía General del CHUA, pues suyos han sido gran parte de los pacientes recogidos para el estudio, por lo que de alguna manera forman parte indirecta del trabajo.

Y por último, en especial a mi familia. A ellos el agradecimiento desde lo más profundo de mí. A mi mujer Mari Carmen, mis hijas Alicia y Natalia, así como a mis padres José Antonio y Paqui, pues a ellos he robado gran parte del tiempo que ha

consumido este cometido. Bien saben el esfuerzo, la dedicación y el empeño empleados y siempre han sabido acompañar, apoyar y entender esta ardua labor. Espero poder devolveros una pequeña parte de lo mucho que os he quitado todo este tiempo. Os quiero mucho.

RESUMEN

Introducción: tras el descubrimiento hace más de tres décadas de la presencia de altas cantidades de ácidos nucleicos circulantes en plasma (CNAPS- *Circulating Nucleic Acids and Serum*), se ha desarrollado un creciente interés en su empleo como biomarcadores moleculares en el cáncer, y particularmente en el cáncer colorrectal (CCR). Uno de los oncogenes más estudiados es *KRAS*, debido tanto a su importancia oncogénica como a algunas de sus características intrínsecas que lo hacen de gran utilidad para el estudio de la enfermedad cancerosa.

Objetivos: comparar distintas técnicas de cuantificación de ADN plasmático total y evaluar separadamente su valor clínico en la estadificación tumoral y pronóstico. Además, detectar específicamente el ADN plasmático tumoral en el perioperatorio inmediato para establecer su valor clínico y pronóstico en relación con la exéresis quirúrgica tumoral.

Material y métodos: en el presente trabajo estudiamos las muestras de ADN de tumor y ADN plasmático recogidas en el perioperatorio de 71 pacientes intervenidos de CCR. Se emplearon técnicas específicas de PCR en tiempo real para la detección de mutaciones del oncogen *KRAS* en tumor y plasma. Para la cuantificación de ADN plasmático total se emplearon también técnicas de PCR en tiempo real, fluorimetría y espectrofotometría.

Resultados: se detectó mutación del oncogen *KRAS* en la pieza tumoral de 17 pacientes (24%). No se observó correlación entre los niveles prequirúrgicos de ADN plasmático total obtenido mediante las distintas técnicas de cuantificación. La cuantificación de ADN plasmático total tampoco se correlacionó con la estadificación tumoral durante el preoperatorio. Sin embargo, las determinaciones de ADN plasmático total y tumoral en el postoperatorio mostraron valor pronóstico y en la monitorización de la enfermedad. Es necesaria la estandarización y elaboración de protocolos para las técnicas laboratorio para evitar la variabilidad de determinaciones y conseguir la implementación en la práctica clínica.

SUMMARY

Introduction: after the discovery more than three decades ago of the presence of high amounts of circulating nucleic acids in plasma (CNAPS-Circulating Nucleic Acids and Serum), a growing interest in their use as molecular biomarkers in cancer has developed, and particularly in colorectal cancer (CRC). One of the most studied oncogenes is *KRAS*, due both to its oncogenic importance and to some of its intrinsic characteristics that make it very useful for the study of cancer.

Objectives: to compare different techniques of quantification of total plasmatic DNA and to evaluate separately its clinical value in tumor staging and prognosis. In addition, to specifically detect the tumor plasma DNA in the immediate perioperative period to establish its clinical value and prognosis in relation to the surgical exeresis of the tumor.

Material and methods: in the present work we studied the samples of tumor DNA and plasmatic DNA collected in the perioperative period of 71 patients undergoing CRC. Real-time PCR techniques were used to detect mutations of the *KRAS* oncogene in tumor and plasma. For the quantification of total plasmatic DNA, real-time PCR, fluorimetry and spectrophotometry techniques were also used.

Results: *KRAS* oncogene mutation was detected in the tumor piece of 17 patients (24%). No correlation was observed between the pre-surgical levels of total plasmatic DNA obtained by the different quantification techniques. The quantification of total plasmatic DNA also did not correlate with tumor staging during the preoperative period. However, the determinations of total and tumor plasmatic DNA in the postoperative period showed prognostic value and in the monitoring of the disease. It is necessary to standardize and develop protocols for laboratory techniques to avoid the variability of determinations and achieve implementation in clinical practice.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
1.-INTRODUCCIÓN.....	17
1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	17
1.2.-CÁNCER COLORRECTAL: INCIDENCIA, EPIDEMIOLOGÍA Y MORTALIDAD.....	21
1.3.- ETIOLOGÍA, CLASIFICACIÓN, Y PRONÓSTICO DEL CCR.....	24
1.3.1.-Etiología del CCR.....	24
1.3.2.- Clasificación del CCR.....	26
1.3.3.- Pronóstico del CCR.....	28
1.4.- PRINCIPALES ALTERACIONES GENÉTICAS Y VÍAS DE CARCINOGENESIS EN EL CCR.....	29
1.4.1.- Inestabilidad cromosómica o “vía supresora”.....	31
1.4.2.- Inestabilidad de microsatélites o “vía mutadora”.....	33
1.4.3.- Hipermetilación o “ vía serrada”.....	36
1.5.- ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES EN PLASMA O SUERO (CNAPS)....	38
1.5.1- Biología del ADN libre circulante.....	40
1.5.2.- Valor clínico del ADN plasmático en la enfermedad cancerosa.....	42
1.5.2.1.- Valor clínico de la cuantificación del ADN circulante.....	42
1.5.2.2.- Valor clínico de la detección del ADN tumoral.....	44
+Mutaciones.....	45
+Integridad de cadena de ADN.....	47
+Hipermetilaciones.....	48
+Inestabilidad de microsatélites (IMS).....	48
1.5.2.3.- ADN viral.....	49
1.5.2.4.- ADN mitocondrial.....	50
1.6.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	52
2.- OBJETIVOS.....	56
-HIPÓTESIS CONCEPTUAL.....	56
-HIPÓTESIS OPERATIVA.....	57
- HIPÓTESIS ESTADÍSTICA.....	57

3.- PACIENTES Y MÉTODOS.....	59
3.1.- SUJETOS DE ESTUDIO.....	59
3.1.1.- Criterios de inclusión.....	59
3.1.2.- Criterios de exclusión.....	59
3.1.3.- Consideraciones éticas.....	60
3.2.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PROCESAMIENTO INICIAL.....	60
3.2.1.- Muestras sanguíneas.....	60
3.2.2.- Muestras de tejidos tumorales.....	61
3.2.3.- Recogida de datos, variables clínicas y seguimiento.....	61
3.3.- EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	62
3.1.- Extracción de ADN de tumores.....	62
3.2.- Extracción de ADN de plasmas.....	63
3.4.- DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE <i>KRAS</i> MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	64
3.4.1.- Detección de secuencias de <i>KRAS</i> mutado en muestras de tumores.....	64
3.5.- MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ADN PLASMÁTICO.....	69
3.5.1.- Cuantificación mediante fluorimetría.....	69
3.5.2.- Cuantificación mediante espectrofotometría de retención de muestra.....	71
3.5.3.- Detección y cuantificación de secuencias de <i>KRAS</i> mediante PCR en tiempo real del ADN plasmático total.....	71
3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75
3.6.1.- Análisis descriptivo.....	75
3.6.2.- Análisis bivariante.....	75
3.6.3.- Análisis multivariante.....	76
3.6.4.- Análisis de supervivencia.....	77
4.- RESULTADOS.....	81
4.1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	81
4.1.1.- Características demográficas y epidemiológicas de la población de estudio.....	81
4.1.2.- Análisis de las curvas de supervivencia.....	88
4.1.2.1.- Tiempo de recidiva o progresión (<i>DFS</i>).....	89
4.1.2.2.- Tiempo de supervivencia total (<i>OS</i>).....	90

4.2.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL EN EL PREOPERATORIO COMPARANDO LAS TRES TÉCNICAS EMPLEADAS.....	95
4.2.1.- Relación de los niveles de ADN plasmático total con las variables clínicopatológicas.....	95
4.2.2.- Relación del ADN plasmático prequirúrgico con el <i>DFS</i> y <i>OS</i>	96
4.2.3.- Análisis multivariante de supervivencia.....	98
4.3.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL EN EL POSTOPERATORIO COMPARANDO LAS 3 TÉCNICAS.....	100
4.3.1.- Relación del ADN plasmático total con las variables clínicopatológicas.....	100
4.3.2.- Relación del ADN plasmático postquirúrgico total con <i>DFS</i> y <i>OS</i>	101
4.3.3.- Análisis multivariante de supervivencia.....	103
4.4.- COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ADN PLASMÁTICO PERIOPERATORIO MEDIANTE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN.....	105
4.5.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ADN PLASMÁTICO PERIOPERATORIO CON VARIABLES CLÍNICAS Y PRONÓSTICO.....	107
4.5.1.- Relación de los niveles de ADN perioperatorio determinados por PCR.....	107
+Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio por PCR con las variables clínicopatológicas.....	108
+Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio por PCR con la supervivencia.....	108
4.5.2.- Relación de los niveles de ADN perioperatorio medidos mediante espectrofotometría.....	110
+Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por espectrofotometría y las variables clínicopatológicas.....	111
+Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por espectrofotometría y la supervivencia.....	111
4.5.3.- Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos mediante fluorimetría.....	113
+Relación entre los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por fluorimetría y las variables clínicopatológicas.....	114
+Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por fluorimetría y la supervivencia.....	114
4.6.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES <i>KRAS</i> EN TEJIDO TUMORAL.....	117
4.6.1.- Relación de la detección de <i>KRAS</i> mutado con las variables clínicopatológicas.....	117
4.6.2.- Relación de la detección de <i>KRAS</i> mutado con la supervivencia.....	118

4.7.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA DETERMINACIÓN DE ADN MUTADO EN PLASMA EN EL PERIOPERATORIO.....	121
4.7.1.- Existencia de ADN mutado en plasma.....	121
4.7.2.- Valor clínico de la determinación de ADN plasmático tumoral antes de la cirugía.....	122
4.7.3.- Relaciones de detección de <i>KRAS</i> plasmático tumoral prequirúrgico con el OS.....	123
4.7.4.- Valor clínico de la determinación de ADN plasmático tumoral después de la cirugía.....	123
4.7.5.- Variaciones en la detección de ADN tumoral después de la cirugía.....	125
5.- DISCUSIÓN.....	129
5.1.- COMENTARIOS AL MÉTODO.....	129
5.1.1.-Elección de ADN circulante como biomarcador en cáncer.....	129
5.2.- ELECCIÓN DE <i>KRAS</i> Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ADN CIRCULANTE EN PLASMA.....	132
5.3.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ADN CIRCULANTE	133
5.3.1.- Técnicas de laboratorio empleadas para la detección y cuantificación del ADN plasmático circulante.....	136
+Fluorimetría.....	137
+Espectrofotometría.....	138
+Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	139
5.3.2.- Correlación entre los métodos de cuantificación de ADN plasmático.....	141
5.4.-VALOR CLÍNICO DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES <i>KRAS</i> EN TEJIDOS TUMORAL.....	142
5.5.- VALOR CLÍNICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL.....	145
5.6.1.- Valor en la estadificación tumoral.....	147
5.5.2.- Valor en el pronóstico de la enfermedad.....	150
5.6.- VALOR CLÍNICO DEL ADN PLASMÁTICO MUTADO	153
5.6.1.- Valor en la estadificación tumoral.....	154
5.6.2.- Valor en el pronóstico de la enfermedad.....	156
5.7.- EFECTO DE LA CIRUGÍA EN LA DETERMINACIÓN PERIOPERATORIA DE ADN PLASMÁTICO MUTADO Y SU RELACIÓN CLÍNICA.....	160
5.8.- COMENTARIO FINAL.....	163

6.- CONCLUSIONES.....	166
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	168
8.- ANEXOS.....	187

ABREVIATURAS

- **AFP:** Alfa-fetoprotein.
- **CA 15.3:** Carbohydrate Antigen 15.3.
- **CA 19.0:** Carbohydrate Antigen 19-9.
- **CA 125:** Carbohydrate Antigen 125.
- **CCR:** Cáncer Colorrectal.
- **CEA:** Carcinoembrionary Antigen.
- **IMS:** Inestabilidad de Microsatélites.
- **CNAPS:** Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum.
- **CHUA:** Complejo Hospitalario Universitario de Albacete.
- **DFS:** Desesase Free Survival.
- **EBV:** Epstein-Barr Virus.
- **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic Acid.
- **EGFR:** Endotelial Growth Factor.
- **FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer.
- **MMR:** Mishmatch Repair.
- **OS:** Overall Survival
- **hTERT:** Telomerasa Transcriptasa Inversa Humana.
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction.
- **PNA:** Peptide Nucleic Acid.
- **PSA:** Protate Antigen.
- **TAE:** Tris-acetato-EDTA.
- **TS:** Targeted Sequencing.
- **VPH:** Virus Papiloma Humano.
- **WGS:** Whole Genome Sequencing.
- **WES:** Whole Exome Sequencing.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- ASPECTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica definitoria es la multiplicación rápida de células anormales de forma coordinada y autónoma, que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos, o diseminarse por todo el organismo.

En las últimas décadas se han identificado alrededor de 200 tipos de cáncer diferentes, y la malignidad de éstos depende básicamente del tipo de tumor, de la agresividad de sus células y otras características biológicas. En general, el comportamiento de las células cancerosas se caracteriza esencialmente por carecer del control reproductivo que requiere su función original, pérdida de sus características primitivas y adquisición de otras que no les corresponden, como la capacidad de invadir más allá de los límites normales del órgano y de forma progresiva y por distintas vías provocar la extensión por el organismo y el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del cuerpo alejadas de la localización original (metástasis). Por otra parte, las diferencias entre tumores benignos y malignos podríamos resumirlas en que los primeros son de crecimiento lento, no se propagan a otros tejidos y rara vez recidivan tras ser extirpados. Por contra, los tumores malignos son de crecimiento rápido, se propagan a otros tejidos, recidivan con frecuencia tras ser extirpados, y tienen capacidad para invadir y metastatizar, de modo que provocan la muerte en un periodo variable si no se tratan a tiempo (fuentes: www.aecc.es, www.who.int).

Se han definido seis alteraciones fisiopatológicas generales que dictan colectivamente el crecimiento maligno celular y que se dan en la mayoría de los procesos tumorales (1). Estos cambios representan la ruptura exitosa de algún mecanismo de defensa contra el cáncer. Éstas son las siguientes:

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento.
- Insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento.
- Evasión de la muerte celular programada o apoptosis.
- Potencial replicativo ilimitado.
- Angiogénesis mantenida.
- Invasión de tejidos a distancia.

Cronológicamente en el desarrollo de un tumor se pueden diferenciar 3 fases: iniciación, promoción y progresión. La fase de iniciación se caracteriza por una serie de mutaciones que acontecen de forma sucesiva. Para que las células iniciadas se conviertan en células tumorales deben ser expuestas a condiciones o agentes favorecedores, dentro de la denominada fase de promoción. En esta fase aparecen las células preneoplásicas y lesiones precursoras o premalignas, y en el final se desarrollan las primeras células neoplásicas. En la fase de progresión se produce un crecimiento invasor de las células transformadas y el avance de la lesión tumoral para convertirse en un tumor metastásico (2).

A nivel molecular, el cáncer surge por mutaciones que provocan un desequilibrio en genes implicados en la proliferación, diferenciación o muerte celular. La proliferación celular implica la reproducción de una célula para formar dos células hijas. La secuencia de las etapas por las que pasa una célula entre una división celular y la siguiente se denomina **ciclo celular** (Figura 1), que puede definirse como un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. Básicamente está compuesto por cuatro etapas: G₁, fase S, G₂ y fase M. La fase S representa el estado de síntesis en el que ocurre la replicación del ADN. Las fases G₁ y G₂ significan GAP 1 y GAP 2, o intervalos, donde la célula se prepara para la siguiente fase, y la fase M implica la partición de la célula para producir dos células hijas, e incluye mitosis (reparto de material genético nuclear) y citocinesis (división del citoplasma). De esta forma todas las células se originan de otra existente con anterioridad.

Durante el fenómeno de tumorigénesis el incremento de la proliferación celular se debe a una disregulación bien por promoción de factores moleculares positivos, bien por

inhibición de los negativos. A grandes rasgos existen tres tipos principales de genes cuyas mutaciones pueden contribuir en los procesos de carcinogénesis: oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores, y todos ellos juegan un papel principal en alguna de las fases de ciclo celular (Figura 1).

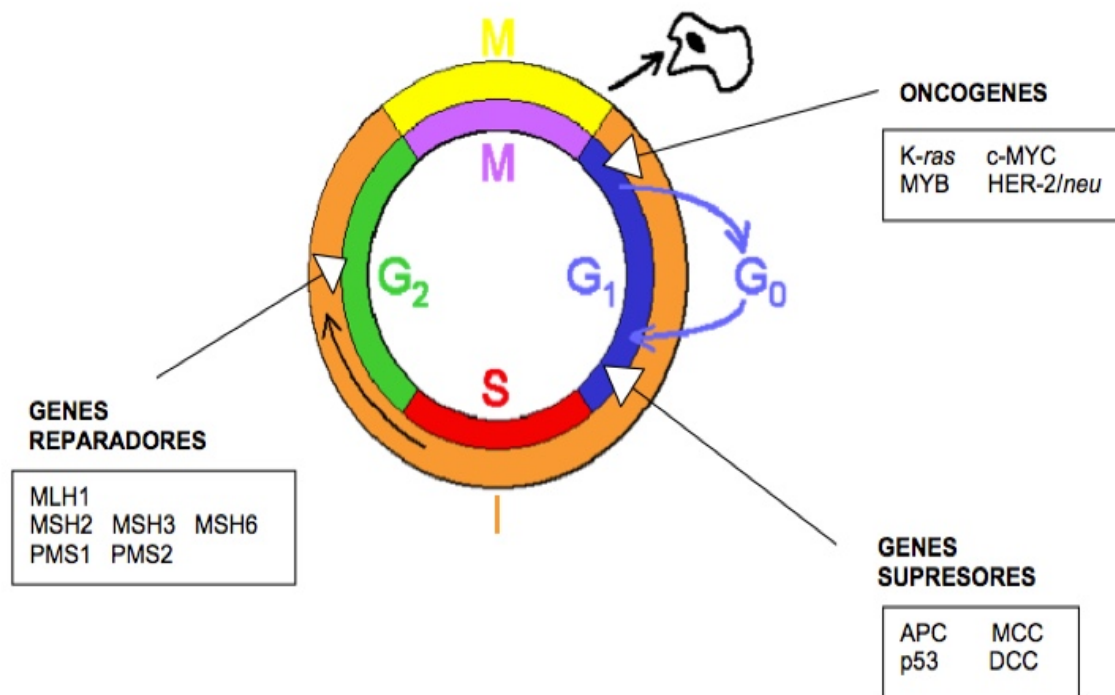


Figura 1: esquema del ciclo celular y genes implicados, cuya alteración favorece el desarrollo tumoral. Fuente: Domínguez Berzosa C. (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.

Los **oncogenes** proceden de proto-oncogenes que sufren mutaciones. Los proto-oncogenes desempeñan papeles funcionales en la regulación normal del ciclo celular y cuando mutan, dan lugar a los oncogenes que sobreexpresan proteínas actuando de forma dominante y desencadenando el inicio de un proceso tumoral. Más concretamente actúan como aceleradores del crecimiento durante la fase G₁ (3).

Por otro lado, los **genes supresores** de tumores codifican proteínas que participan en la inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis (4), por lo que su alteración da lugar a una pérdida de la funcionalidad de la proteína y, por tanto, al crecimiento celular descontrolado. Las alteraciones en los genes supresores de tumores suelen ser recesivas, ya que un único alelo intacto es normalmente suficiente para

inhibir el crecimiento, así que los dos alelos del gen deberían estar mutados para que la pérdida de función se aprecie fenotípicamente, aunque existen excepciones (4). En el ciclo celular intervienen antes de la entrada en la fase S, y es necesaria su activación para favorecer la aparición y el desarrollo del tumor.

Por último, los **genes reparadores** actúan en la fase G2. Son los responsables de la reparación de los errores en la cadena de ADN producidos durante la replicación, o inducidos por radiaciones o agentes químicos. Cuando el sistema de reparación del ADN es defectuoso como resultado de mutaciones adquiridas o heredadas, la tasa de acumulación de mutaciones en el genoma se eleva a medida que se producen divisiones celulares (2).

Según la teoría monoclonal de carcinogénesis de Sell y Pierce las mutaciones derivan de una única célula precursora (5). Sin embargo, es importante destacar que una única mutación en el material genético no es capaz de transformar a una célula sana en cancerosa, sino que se requieren varias o incluso múltiples mutaciones para que ocurra dicha transformación. Serán estos cambios en los genes que controlan el comportamiento de la célula cancerígena lo que brinde ventajas que otorgan una mejor supervivencia y expansión proliferativa originando una población o clon de células malignas que origina al tumor primario (2).

Además, diversos estudios recientes han puesto de manifiesto cómo el desarrollo tumoral o carcinogénesis es un proceso mucho más complejo de lo que podría pensarse, puesto que se ha demostrado la presencia de distintas mutaciones genéticas dentro las poblaciones celulares que coexisten en el mismo tumor. Es un fenómeno que se denomina **heterogeneidad intratumoral**, con importantes implicaciones en el diagnóstico y tratamiento del cáncer en estos pacientes, por lo que es probable que el proceso tenga una mayor complejidad en su origen y desarrollo, como veremos más adelante (6-8).

1.2.-CÁNCER COLORRECTAL: INCIDENCIA, EPIDEMIOLOGÍA Y MORTALIDAD

Esta patología es considerada un problema de salud pública de primer orden en la actualidad. Según estimaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud), hasta el año 2030 la mortalidad por cáncer se incrementará un 45% como consecuencia del aumento demográfico y el envejecimiento poblacional (fuente: World Health Organization; www.who.int). Se estima que afectará a uno de cada 3 hombres y una de cada 4 mujeres durante su vida (9).

A nivel mundial, el cáncer es la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en aquellos países en vías de desarrollo. Los casos de cáncer se incrementan en los países desarrollados por el crecimiento de la población y su envejecimiento, así como por la adopción de estilos de vida asociados como el sedentarismo, una dieta rica en grasas y el tabaco (10).

El cancer en España constituye la segunda causa de muerte (26.9% de todas las defunciones) por detrás de los accidentes cardiovasculares (fuente: Instituto Nacional de Estadística 2008). El envejecimiento en particular de la población española, el incremento en la incidencia de tumores malignos y la mejora en la supervivencia de los enfermos de cáncer debido a los avances diagnósticos y terapéuticos ha supuesto un aumento significativo de la prevalencia del cáncer en la población española (11).

Específicamente, el cáncer colorrectal (CCR) es el tercero más frecuente en el mundo y la cuarta causa de mortalidad por este motivo. Supone aproximadamente 1,2 millones de nuevos casos anuales, con 600.000 muertes por año (10, 12). Según un estudio reciente realizado por Ferlay *et al.*, se estima que aproximadamente el 9,7% de todos los cánceres diagnosticados en el mundo son de colon (12).

En Europa, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres (9), y más concretamente en España es el tercero en frecuencia en hombres, tras el cáncer de pulmón y próstata, y el segundo en las mujeres tras el cáncer de mama

(fuente: www.aecc.es). Según los datos de REDECAN (Red Española de Registros de cáncer), en el año 2014 se registraron 39553 casos de cáncer de colon y recto en España. Si se tienen en cuenta ambos sexos, el CCR es el que presenta mayor incidencia (15%) (fuente: www.aecc.es).

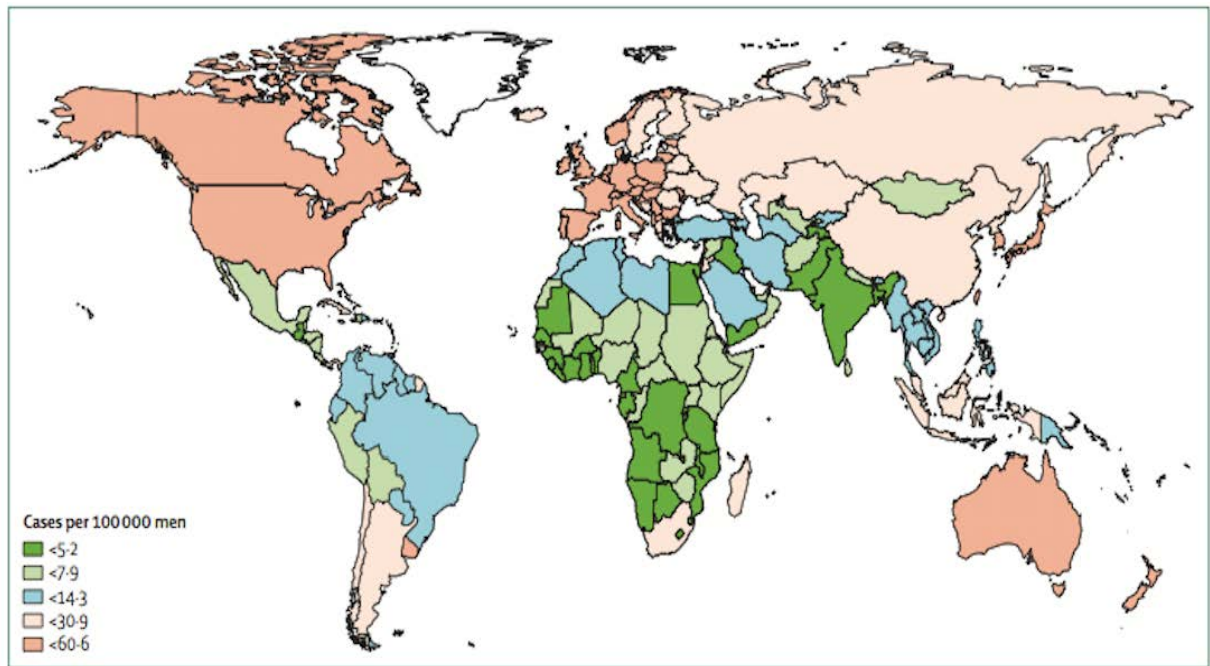


Figura 2: mapa de la distribución del CCR. Datos de GLOBOCAN 2008.

Al igual que la mayoría de los tumores, el CCR se considera una enfermedad con origen multifactorial que puede desarrollarse como consecuencia de la combinación de factores genéticos y ambientales (13). En estudios demográficos se ha observado que las tasas de incidencia del CCR varían en relación con las diferencias raciales y los distintos estilos de vida dependiendo de la zona geográfica y las costumbres de cada comunidad. Así, algunos grupos de inmigrantes aumentan o disminuyen el riesgo asociado a su comunidad original cuando se adaptan al estilo de vida en sus países de acogida, asimilando el riesgo de estos últimos, lo que sugiere un impacto ambiental (2, 9, 14-18). Por otra parte, el aumento de la incidencia en los familiares de pacientes diagnosticados de CCR apunta también al impacto de la participación de factores hereditarios. Estudios de riesgo realizados en gemelos monocigotos y heterocigotos para

diversos tipos de cáncer sugieren que los factores ambientales contribuyen en mayor proporción al riesgo de cáncer que los factores genéticos hereditarios (19).

Desde el punto de vista epidemiológico se ha observado que el riesgo de padecer CCR aumenta con la edad (13), elevándose al 0,87% en individuos de cincuenta años de edad y al 5,8% en personas de más de 80 años. Así, es el tipo de cáncer más frecuente entre las personas de más de 75 años de edad (19), con una edad media de presentación de 70 años en los países desarrollados (20, 21), con una incidencia muy baja por debajo de la década de los 50 años, y tiene mayor riesgo en hombres que en mujeres en todos los países (9, 22). Excepcionalmente (6%), pueden encontrarse casos por debajo de los 30 años, principalmente asociado a causas genéticas y casos de poliposis familiar (22).

Respecto a la localización se ha observado que la mayoría de los CCR se encuentran en el colon descendente, en el colon sigmoide y en el recto, con un desplazamiento proximal de las lesiones asociado al envejecimiento poblacional (19).

En cuanto a la mortalidad ligada al CCR, evolutivamente en la mayoría de los países desarrollados la incidencia y mortalidad por CCR aumentó a lo largo del siglo XX. Así, en España, en la década comprendida entre 1987 y 1997, la mortalidad por cáncer aumentó del 9,5 al 12,2/100.000/año para las mujeres, y del 13 al 19/100.000/año para los hombres (19, 23). Sin embargo, esta tendencia en algunos países desarrollados como EEUU, Canadá, países del este de Europa, etc, se ha invertido, y se ha observado una estabilización y moderado descenso de la mortalidad relacionada con el CCR desde la década de 1980, probablemente en relación con los cambios en los patrones de estilo de vida y alimentación; o la implantación y mejora de los métodos de prevención y diagnóstico precoz con el uso de la sigmoidoscopia y la colonoscopia con extirpación temprana de pólipos precancerosos y avances en el tratamiento del cáncer (10, 23-26). A pesar de ello, las tasas de mortalidad continúan siendo altas en las zonas más desfavorecidas con menos recursos económicos e infraestructuras de salud a su alcance, como zonas de América del Sur y Central, y áreas rurales de China (14, 27).

1.3.- ETIOLOGÍA, CLASIFICACIÓN, Y PRONÓSTICO DEL CCR

1.3.1.-Etiología del CCR

La etiología del CCR es extremadamente compleja y multifactorial, producto de una interacción de factores genéticos y ambientales (Figura 3). De esta forma se ha observado que en torno a dos terceras partes del CCR se desarrollan en personas sin factores de riesgo conocidos; son los llamados CCR esporádicos. Por otra parte, en el resto de pacientes pueden identificarse factores predisponentes, como la presencia de pólipos en el colon, la historia familiar positiva de CCR o pólipos adenomatosos, los síndromes de CCR hereditarios (5-10%), la enfermedad inflamatoria intestinal o diversos factores ambientales (19, 28) (tabla 1).

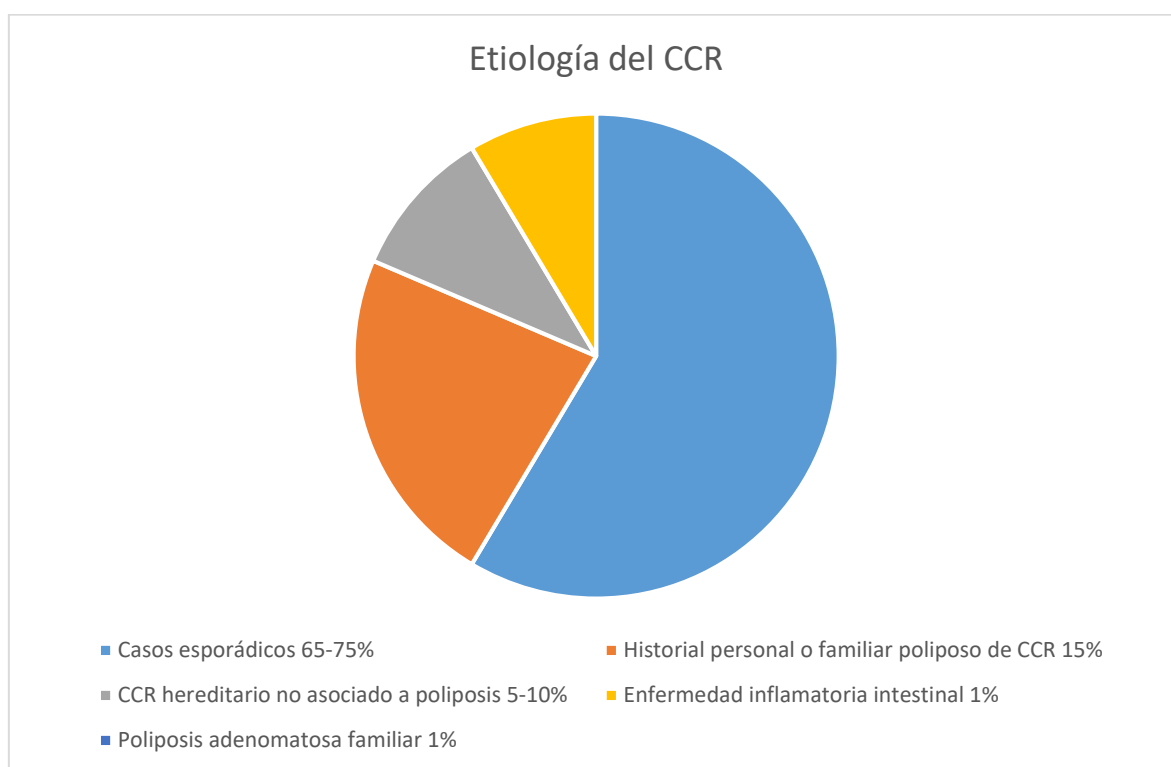


Figura 3: resumen de la etiología del CCR.

FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER COLORRECTAL
Historia familiar de CCR o pólipos en un familiar de primer grado (padres, hermanos, hijos) menor de 60 años o en 2 familiares de primer grado de cualquier edad.
Historia familiar de síndromes de CCR hereditario (poliposis adenomatosa familiar y CCR hereditario no polipoide).
Historia personal de CCR.
Historia personal de pólipos adenomatosos.
Historia personal de enfermedad inflamatoria crónica intestinal.

Tabla 1: factores de riesgo de CCR.

Como hemos visto, el impacto de los factores ambientales queda de manifiesto al observarse cómo las tasas de incidencia del CCR varían en relación con las diferencias raciales y los distintos estilos de vida dependiendo de la zona geográfica y las costumbres de cada comunidad.. Por ello, diversos estudios inciden en destacar factores como la alimentación, o hábitos de vida insalubres como el consumo de alcohol y el tabaco como factores de riesgo asociados al desarrollo del CCR, en lo que se conoce como estilo de vida occidental (9, 14, 28).

Únicamente el 15-20% de pacientes con CCR agrupa a individuos en los cuales aparece un componente familiar, es decir, tienen familiares de primer o segundo grado con la enfermedad. Sin embargo, tan sólo entre un 1 y el 5% de estos últimos heredan la predisposición a padecer la enfermedad a través de un patrón mendeliano (29) (Tabla 2).

La línea que separa los casos de cáncer hereditario y los casos familiares no está claramente establecida debido a la dificultad para fijar unos criterios de clasificación. Por lo tanto, exceptuando los síndromes hereditarios manifiestamente definidos, resulta bastante complejo discriminar cáncer esporádico y familiar y, en consecuencia, el porcentaje de CCR considerado familiar posiblemente no esté ajustado a la realidad (29). En la tabla 2 mostramos varios síndromes en los cuales el desarrollo de tumores colorrectales es un rasgo característico.

SÍNDROME	ALTERACIONES GENÉTICAS
Adenoma y carcinoma colorrectal múltiple (MAP)	<i>MYH</i>
CCR hereditario no asociado a poliposis (HNPCC)	<i>MSH2, MLH1, MSH5, MSH6, PMS1, PMS2, TGF-B, CDH1, CDH1, MLH3, EXO1</i>
Poliposis adenomatosa familiar (PAF)	<i>APC, MYH, AXIN2</i>
CCR hereditario y agenesia dental	<i>AXIN2</i>
Poliposis juvenil	<i>MADH4, BMPRIA</i>
Sdm de Bannayan.Riley-Ruvacalba	<i>PTEN</i>
Sdm de Cowden (hamartomatosis múltiple)	<i>PTEN</i>
Sdm de Gardner	<i>APC</i>
Sdm de Muir-Torre	<i>MSH2, MLH1</i>
Sdm de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>
Sdm de Turcot	<i>PMS2, MLH1</i>

Tabla 2: principales síndromes de CCR con las alteraciones genéticas características.

1.3.2.- Clasificación del CCR

Los distintos sistemas de clasificación por estadios en los tumores sólidos permiten asegurar un lenguaje común para comparar las diferentes experiencias clínicas publicadas. En el caso del CCR existe la clásica estadificación propuesta por Dukes en 1932 y sus modificaciones posteriores de Astler y Collier (Tabla 3), que se limitaban en un principio al carcinoma de recto, pero posteriormente se aplicaron al CCR en general. Combina tres variables: la profundidad de la penetración tumoral en la pared intestinal y la presencia o ausencia de metástasis en los nódulos linfáticos regionales y a distancia. Estos factores están relacionados con la supervivencia del enfermo a los cinco años.

DUKES	DUKES MODIFICADO POR ASTLER Y COLLER
A Lesión superficial que afecta a la mucosa	A Lesión superficial que afecta a la mucosa
B Lesión que penetra en la capa muscular y/o serosa	B1 Invade la muscular propia B2 Invade la serosa
C Afectación de ganglios linfáticos	C1 1-4 ganglios regionales positivos C2 >4 ganglios regionales positivos
D Metástasis	D Metástasis

Tabla 3: clasificación de Dukes.

Actualmente esta clasificación ha sido progresivamente reemplazada por el TNM (7ª edición. Fuente:<http://www.cancerstaging.org/>). Este sistema de estadificación es actualmente el estándar recomendado por las principales comisiones de expertos y de los institutos especializados en cáncer en gran parte del mundo occidental desarrollado. Desde 1987, la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el Comité Americano Conjunto sobre Cáncer (AJCC) promueven esta clasificación que se basa en el tamaño y la penetración del tumor (T), el compromiso de los linfonodos (N) y la presencia o ausencia de metástasis (M). Es un sistema en permanente revisión de acuerdo a la información obtenida en bases de datos acerca de miles de pacientes tratados en hospitales americanos. El TNM posee una concepción multidisciplinaria que involucra a cirujanos, patólogos, radioterapeutas y oncólogos clínicos, y permite desarrollar criterios uniformes para evaluar y comparar los resultados de las distintas formas de tratamiento (2, 14).

TNM7 - Cáncer de colon y recto (AJCC 2010)

T

Tx - Tumor primario no evaluables
T0 - No evidencia de tumor primario
Tis - Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lamina propia.
T1 - Tumor que invade la submucosa.
T2 - Tumor que invade la muscular propia
T3 - Tumor que penetra la muscular propia hasta el tejido pericólorrectal*
T4a - Tumor que invade el peritoneo visceral*,**
T4b - Tumor que invade estructuras u órganos adyacentes*,**

N

Nx - Ganglios linfáticos no evaluables.
N0 - No metástasis a ganglios linfáticos regionales. Se debe usar pN0 si todos los ganglios linfáticos examinados fueron negativos para metástasis, independiente del número de ganglios resecados.
N1 - Metástasis de uno a tres ganglios linfáticos regionales
N1a - Metástasis a un ganglio linfático regional
N1b - Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales
N1c - Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio, o tejido no peritonizado pericólico o perirrectal, sin compromiso ganglionar regional.
N2 - Metástasis de tres o más ganglios linfáticos regionales
N2a - Metástasis de 3 a 6 ganglios linfáticos regionales
N2b - Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

M

M0 - No metástasis a distancia
M1 - Metástasis a distancia
M1a - Metástasis confinada a un solo sitio u órgano.
M1b - Metástasis en más de un sitio u órgano.

Estadíos

Estadio 0 - Tis N0 M0
Estadio I - T1 N0 M0; T2 N0 M0
Estadio IIA - T3 N0 M0
Estadíos IIB - T4a N0 M0
Estadio IIIA - T1-T2 N1/N1c M0; T1 N2a M0
Estadio IIIB - T3-T4a N1/N1c M0; T2-T3 N2a M0; T1-T2 N2b M0
Estadio IIIC - T4a N2a M0; T3-T4a N2b M0; T4b N1-N2 M0
Estadio IVa - Cualquier T Cualquier N M1a
Estadio IVb - Cualquier T Cualquier N M1b

* Se utiliza las letras V y L para denotar la presencia o ausencia de compromiso vascular o linfático, respectivamente. De igual forma la presencia o ausencia de invasión perineural se establece con PN.

** La invasión directa en T4 incluye el compromiso de otros órganos u otros segmentos del colon o recto como resultado de la extensión directa a través de la serosa y confirmada por patología. Para cánceres de ubicación retroperitoneal o subperitoneal, la invasión directa de otros órganos o estructuras por extensión más allá de la muscular propia como invasión de la pared posterior en colon descendente que comprometa el riñón izquierdo o la pared abdominal, o en cáncer de recto con invasión de la próstata, vesículas seminales, cérvix o vagina. Si hay compromiso macroscópico de un órgano vecino se clasifica cT4b. Si en la patología NO se evidencia compromiso del órgano adyacente, se clasifica como pT1-T4a, según el caso

Tabla 4: clasificación TNM 7ª edición. Fuente: <http://www.cancerstaging.org/>

1.3.3.- Pronóstico del CCR

El pronóstico de los pacientes con CCR ha mejorado en las últimas décadas en los países desarrollados, con tasas de supervivencia de casi el 65% en zonas como Australia, Canadá, EEUU y varios países de Europa (14). Sin embargo, el factor pronóstico vital más importante viene determinado por una detección precoz de la enfermedad, de modo que puedan instaurarse adecuados métodos de tratamiento potencialmente curativos. Así, la supervivencia a 5 años del CCR es excelente si la enfermedad se identifica en los primeros estadios, cuando se encuentra localizada en el colon (95% para estadio I y 82% para estadio II), pero disminuye al 61% para pacientes con diseminación regional a los ganglios linfáticos (estadio III) y es sólo del 8% para pacientes con metástasis a distancia (estadio IV). Únicamente en estadios I-II de la enfermedad la cirugía tiene potencial curativo por sí misma. En el resto de estadios es necesario combinar su acción con terapias complementarias como la quimioterapia previa o tras la resección quirúrgica para mejorar los resultados de supervivencia a medio y largo plazo (30).

1.4.- PRINCIPALES ALTERACIONES GENÉTICAS Y VÍAS DE CARCINOGENESIS EN EL CCR

El CCR se desarrolla como consecuencia de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que incitan la transformación de células normales del epitelio cólico en células tumorales. Este proceso es largo y puede tardar entre 8-12 años (10), y según el mecanismo principal de acción, los genes implicados se agrupan en 4 grandes categorías:

- **Protooncogenes:** *KRAS*, *BRAF*, *src* y *c-myc*.
- **Genes supresores de tumores:** *APC*, *DCC*, *p53*, *MCC*, *DPC4*.
- **Genes reparadores:** *hMSH2*, *hMLH1*, *PMS1*, *PMS2*.
- **Genes modificadores:** gen de la fosfolipasa A2, gen de la COX2, gen de CD44v.

En condiciones normales estos genes participan en la regulación del ciclo vital celular, actuando en el conjunto de sucesos que definen cuándo una célula debe crecer y proliferar. Sin embargo, durante el proceso de carcinogénesis se producen cambios que favorecen la expansión replicativa celular mediante procesos como la expresión excesiva de oncogenes, o por contra la expresión insuficiente de genes supresores o de genes reparadores.

Distintas teorías tratan de explicar el desarrollo del CCR, y hasta fechas recientes seguía vigente el modelo clásico de carcinogénesis formulado por Fearon y Vogelstein en 1990 que se basaba en la secuencia conocida como adenoma-carcinoma, cimentada en 3 pilares básicos: el primero, que un CCR es el resultado de una activación mutacional de oncogenes, junto a una inactivación mutacional de genes supresores tumorales; segundo, que son necesarias al menos 4 o 5 mutaciones de genes diferentes para el desarrollo del cáncer; tercero, que la acumulación de alteraciones genéticas, en lugar de su orden es responsable del comportamiento genético del tumor. Este modelo, ha servido de paradigma para la mayor parte de los tumores epiteliales (2) (Figura 4).

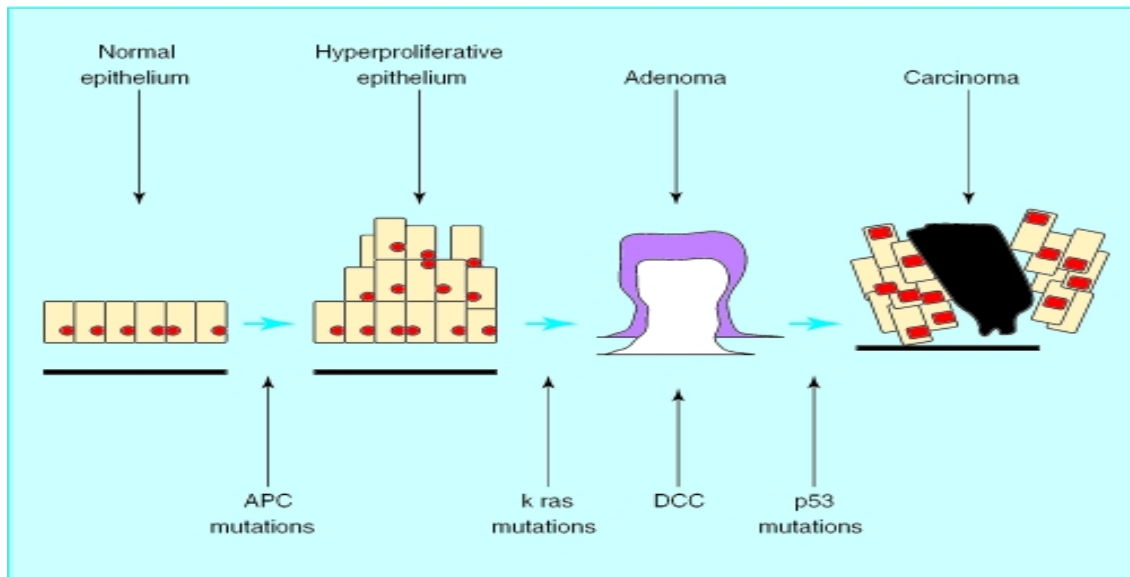


Figura 4: esquema de la secuencia adenoma-carcinoma. Fuente: Hardy RG, et al. *British Journal of Medicine* 2000 Oct 7;321(7265):886-.

Sin embargo en la actualidad, todos los avances en la investigación de las bases moleculares del CCR han llevado a profundizar y matizar dicho modelo y se han identificado hasta tres grandes vías de carcinogénesis. El proceso tumorigénico desencadenaría la transformación maligna celular a través de la progresión guiada de múltiples pasos, de modo que, aunque haya una secuencia preferente, lo importante es la acumulación de cambios mutacionales que a la larga darán el fenotipo final. Ello ha conducido a la idea de que cada CCR es una entidad patológica independiente, y por tanto, no hablamos de una única enfermedad, sino un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por un sustrato genético/epigenético diferenciado, con rasgos fenotípicos concretos, pero diferenciada del resto de los CCR (31).

Las principales vías carcinogénicas, que se explicarán a continuación con las alteraciones genéticas predominantes, son responsables del desarrollo tumoral, y no son mutuamente excluyentes entre sí.

1.4.1.- Inestabilidad cromosómica o “vía supresora”

Los tumores derivados de esta vía presentan frecuentemente alteraciones del cariotipo, con una forma de inestabilidad genética caracterizada por ganancias y pérdidas de cromosomas enteros o grandes fragmentos, conocido como pérdida de heterocigosidad, y contienen por tanto aneuploidía. El factor desencadenante principal de esta vía es la pérdida de función del gen supresor *APC*, y es por ello por lo que a esta vía se le denomina “vía supresora”. En esta vía se enmarcan la mayoría de los CCR esporádicos (85%) y los casos de CCR asociados a Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF). Esta pérdida de heterocigosidad es responsable a su vez de la inactivación de oncogenes y genes oncosupresores (*KRAS*, *DCC*, *APC*) (19). Destacamos algunas de las alteraciones moleculares más importantes:

- **KRAS**: es el oncogén más frecuentemente mutado en la neoplasia de colon esporádica. Este gen codifica la síntesis de tres proteínas de 21 KDa: *H-RAS*, *N-RAS* Y *K-RAS* (13) que tienen función ATP-asa, y ejercen como un interruptor en la transducción de señales desde la superficie celular hasta los sitios blanco celulares (2, 13). Se encuentra mutado en hasta un 40-50% de los pacientes con CCR y también en adenomas mayores de un centímetro (2). Se localiza en el cromosoma 12, y la mayoría de las mutaciones se encuentran en el codón 12 del exón 1, y en menor proporción en los codones 13 y 61 (Tabla 5). Estas mutaciones están asociadas a una hiperactivación de la proteína que codifica, lo que produce una cascada de señalización que modifica la expresión de múltiples genes encargados de la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la migración, el crecimiento, la quimiotaxis y la diferenciación celular (32), y confieren un peor pronóstico clínico, con mala respuesta a tratamientos quimioterápicos anti EGFR (22, 33).

MUTACIÓN	CAMBIO DE BASE
Gly12Ala	GGT>GCT
Gly12Asp	GGT>GAT
Gly12Arg	GGT>CGT
Gly12Cys	GGT>TGT
Gly12Ser	GGT>AGT
Gly12Val	GGT>GTT
Gly13Asp	GGC>GAC

Tabla 5: principales mutaciones *KRAS* en el CCR.

-APC (del inglés, “*Adenomatous Polyposis Coli*”): es el primer gen implicado en la carcinogénesis colorrectal. Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (región 5q21). Codifica una proteína de 310 KDa con múltiples dominios implicada en diversas funciones biológicas como la apoptosis, necesaria para la renovación del epitelio del colon, en funciones de adhesión celular y en procesos de regulación del ciclo celular y reparación del ADN (2, 13).

La inactivación del gen *APC* es una característica propia de una mutación germinal de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF), y también puede detectarse en hasta el 50-85% de los CCR esporádicos, y produce la síntesis de una proteína truncada no funcional. En CCR esporádicos y adenomas, incluyendo las lesiones displásicas más pequeñas, se han descrito mutaciones en *APC* entre el 60-80% de los casos (13) y al igual que *KRAS*, se considera un evento precoz en la progresión de adenoma a carcinoma (22), puesto que la inactivación de un solo alelo del gen *APC* es suficiente para la aparición de pólipos adenomatosos, lo que sugiere que puede ser un evento temprano en el desarrollo de los cánceres esporádicos (34, 35).

-DCC4: la familia DCC o SMAD está compuesta por 8 genes que codifican diversas proteínas de señalización celular que regulan el crecimiento y la diferenciación. De ellas, la mutación más frecuente se conoce como *SMAD4* (36). El gen *SMAD4*, también llamado *DPC4*, es un gen supresor de tumores situado en el cromosoma 18 (18q21.1). Codifica una proteína de 522 aminoácidos implicada en la regulación de la señal de transducción TGF- β . El TGF- β o factor de crecimiento transformante beta, tiene muchos efectos diferentes en función del tipo de tejido, y en la mayoría de las células epiteliales actúa como inhibidor del crecimiento. El gen *SMAD4* se encuentra frecuentemente mutado en las células de varios tipos de cáncer, como el de páncreas y el de colon, también en la poliposis intestinal juvenil. La pérdida de expresión de *SMAD4* cambia el patrón del TGF- β de factor inhibidor de crecimiento a factor promotor de crecimiento, lo que conlleva un aumento de la capacidad tumorigénica y de potencial metastásico del tumor, y por tanto comporta un factor de mal pronóstico (36, 37).

Se encuentra deleccionado en el 50% de los adenomas avanzados y en el 70% de los CCR, sin embargo, es poco común en adenomas intermedios y tempranos, por lo que se le ha relacionado con el avance de adenomas intermedios a tardíos (35, 38).

-Mutaciones de p53: es un gen supresor, considerado el “guardián del genoma” (18), y es uno de los que más ampliamente se ha estudiado, debido a que se encuentra alterado en aproximadamente un 50% de los tumores humanos y en más del 80% de los colorrectales (39) (40). Está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y el gen codifica una fosfoproteína nuclear que funciona como factor de transcripción. Dicha proteína es activada tras producirse un daño en el ADN por factores endógenos, como los radicales libres, o exógenos como las radiaciones (18). En condiciones normales, en respuesta al daño del ADN aumenta la expresión de la proteína p53 normal, lo que a su vez regula la transcripción o los genes que inducen al detenimiento del ciclo celular o a la muerte celular por apoptosis. En consecuencia, el producto del gen p53 evita que las células que han adquirido ADN dañado (mutación) avancen en el ciclo celular y las elimina cuando no pueden ser reparadas (2). De este modo, la proteína a la que da lugar actúa como factor de transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular y en la apoptosis, lo que asegura la integridad del genoma celular, y por tanto, la pérdida de función de p53 conlleva una mayor acumulación de mutaciones en otros genes (18).

Se cree que está implicado en la transición de adenoma a carcinoma (35) y al parecer, la frecuencia de mutaciones en la mucosa displásica refleja la gravedad de la misma, de forma que pasa del 5-10% en las células de mucosa de pólipos con bajo grado de displasia, hasta un 50% en mucosas con pólipos con displasia de alto grado y en un 75% de lesiones invasoras (41).

De forma global, en esta vía se encuadran alrededor de un 60% de los casos de CCR, que siguen el modelo original de Fearon y Vogelstein de secuencia adenoma-carcinoma (31). Como ya se ha dicho, este modelo se basa en la teoría de que la mayoría de los cánceres derivan mayoritariamente de pólipos adenomatosos previos, hecho que se basa en varios de los siguientes argumentos:

- En estudios endoscópicos y de autopsias se ha demostrado que el CCR es más común en pacientes con pólipos adenomatosos.
- Los pacientes con pólipos mayores de 1 cm de diámetro tienen mayor riesgo de padecer CCR.
- La media de edad de los pacientes diagnosticados de pólipos adenomatosos es diez años menor que la de los pacientes diagnosticados de CCR.
- La extirpación endoscópica de los pólipos adenomatosos reduce la incidencia de CCR.

Como contraposición a estos hallazgos hay que resaltar que no todos los pólipos acaban degenerando hacia un carcinoma. Se estima que sólo uno de cada 400 dará lugar finalmente a un tumor maligno, como ponen de manifiesto estudios endoscópicos. Además, la diferencia de edad media entre pacientes con pólipos adenomatosos y cánceres invasores, la duración del efecto protector de la sigmoidoscopia en la prevención del CCR y la observación directa de la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados de pólipos adenomatosos que no fueron extirpados sugieren que la progresión desde un pólipo adenomatoso hasta un carcinoma invasor requiere un mínimo de 10-15 años (2).

Puesto que las vías no son excluyentes es importante destacar que alrededor del 60% de los tumores que siguen esta vía presentan también características comunes con el fenotipo metilador (31), que veremos más adelante.

1.4.2.- Inestabilidad de microsatélites o “vía mutadora”

En esta vía se produce una alteración del sistema de reparación de errores de emparejamiento del ADN o MMR (del inglés “*mismatch repair*”), encargado de corregir los fallos que se producen durante la replicación, y controlado por varios **genes mut** (del inglés “*mutator genes*” -genes mutadores-), que son conocidos como **genes reparadores** (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, entre otros). A esta vía se le conoce como “**vía mutadora**”, y la característica molecular principal para detectarla es que producen

longitudes alteradas de microsatélites (secuencias cortas y repetitivas de nucleótidos) en tumores en comparación con células sanas. Esto es lo que se conoce como “inestabilidad de microsatélites” (IMS), y se asocia a un incremento significativo de mutaciones en todo el genoma (2). Con ello se acelera el proceso de tumorigénesis, pues pueden afectar a oncogenes y genes supresores, de modo que durante el proceso de replicación se estima que la acumulación de mutaciones es del orden de 100 a 1000 veces mayor.

Hoy en día los tumores con IMS se refieren a aquellos que presentan IMS alta (2 ó más microsatélites alterados según el panel de Bethesda (42), y está presente en un 15% de los CCR, pudiendo producirse de dos formas diferenciadas. En primer lugar, las que suceden de forma característica en los casos de CCR no polipósico o **síndrome de Lynch**, cuya base molecular serían mutaciones en la línea germinativa de cualquiera de los genes relacionados con el sistema de reparación del ADN; en este síndrome *hMLH1* se encuentra mutado en un 50% de los casos, *hMSH2* en un 40%, *hMSH6* en un 10% y *hPMS2* en menos del 5%. En segundo lugar, en el que se hallan englobados una parte de los casos esporádicos, donde el porcentaje de alteración de estos genes es menor, en torno al 15%. En ellos el mecanismo de la IMS es debido a alteraciones epigenéticas relacionadas con la hipermetilación de la región promotora de los genes del sistema de reparación del ADN (con mayor frecuencia a nivel de *MLH1*) (13).

La presencia de IMS alta se asocia con ciertos rasgos fenotípicos característicos, que no exclusivos, de este tipo de tumores. Así, existe una mayor frecuencia de tumores en mujeres mayores, con diferenciación mucinosa, mayor frecuencia de tumores con células "en anillo de sello", con reacción linfocitaria tipo "Crohn", o con presencia de infiltrado linfocitario peritumoral, necrosis tumoral, o mayor frecuencia de tumores pobremente diferenciados, o de localización a nivel del colon derecho (31). Ciertos estudios muestran peor respuesta a diversos tratamientos con quimioterápicos como 5-FU y cisplatino (13).

Por otro lado, y de la misma forma que sucediera también para algunos casos con inestabilidad cromosómica, en este grupo de tumores existe a su vez solapamiento con otra de las vías, la vía del fenotipo metilador, siendo aproximadamente un 40% de los

tumores los que presentan fenotipo IMS los que se pueden asociar a la vía "serrada" de CCR (31).

1.4.3- Hipermetilación o “vía serrada”

Las islas CpG son regiones del ADN que conforman aproximadamente un 40% de los promotores de los genes de mamíferos. Son regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos (de ahí la "p" en CpG). Estos sitios CpG se encuentran desmetilados si los genes están expresados, y por tanto, su metilación en los promotores de los genes puede inhibir la expresión del gen en cuestión (31).

La inactivación transcripcional mediante la metilación de islas CpG promotoras de genes supresores de tumores es un importante mecanismo de carcinogénesis, también denominado **fenotipo metilador**, provocando alteraciones en genes involucrados en el control del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis. El mecanismo a través del cual tiene lugar dicha metilación se ha detectado en una proporción de CCR cercana al 35%. Esta denominada también “**vía serrada**” de carcinogénesis colorrectal surgiría de una lesión precursora serrada (cuya caracterización histológica engloban los pólipos hiperplásicos, pólipos serrados sesiles, y adenomas serrados), y parece no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica de adenoma-carcinoma (31).

En este tipo de tumores pueden identificarse ciertos rasgos diferenciadores. Así, parece que se presentarían más en mujeres, tumores con localización a nivel proximal del colon, más frecuencia de tumores pobremente diferenciados y, desde el punto de vista molecular, una mayor presencia de mutaciones del gen *BRAF*, mientras que la tasa de mutaciones en *TP53* es más baja (13). Estas lesiones constituyen alrededor de un 9% de los pólipos colorectales, y al ser mínimamente elevados requieren técnicas endoscópicas avanzadas para minimizar el riesgo de subestimar estas lesiones (13). Las alteraciones genéticas más frecuentes ligadas a esta vía se describen a continuación:

-Aumento de mutaciones del gen *BRAF*: es un oncogén miembro de la familia RAF-quinasa que participan en la vía de señalización que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis. Esta mutación se conoce también como *V600E*, y consiste en una sustitución de la valina en su posición 600 por un ácido glutámico. Se encuentra constitutivamente activa debido a mutaciones en su estructura primaria entre un 5-15% de los carcinomas de colon y recto y se observa casi exclusivamente en tumores esporádicos con IMS alta, pero no en los pacientes con síndrome de Lynch. Un hecho demostrado es que la mutación de *KRAS* y *BRAF* son mutuamente excluyentes, es decir, cuando uno de estos genes presenta una mutación el otro excepcionalmente está mutado. Se debe señalar que cuando *KRAS* o *BRAF* se encuentran mutados, lo que ocurre en alrededor del 55% de los pacientes pueden tener la condición de no respondedores a la terapia anti-EGFR y presentan peor pronóstico (30).

El mecanismo de los CCR más comunes que surgen a través de esta vía parece iniciarse mediante una mutación que activa el gen *BRAF*, lo que ocasiona una inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon. A partir de este suceso, las lesiones serradas pueden dar lugar a pólipos hiperplásicos o pólipos serrados sésiles. Estas lesiones son muy propensas a la metilación de islotes CpG de regiones promotoras de múltiples genes, y por tanto, provocaría un silenciamiento epigenético (inactivación indirecta del gen) de varios genes. En el caso de la metilación del promotor de *MLH1*, muy frecuente en estos casos, originan los CCR esporádicos con IMS. Parece ser, sin embargo, un evento tardío, pero a partir del cual se produce una rápida adición de mutaciones de otros genes, como sucede también en el síndrome de Lynch, y por tanto, la progresión tumoral más rápida (31).

En conjunto el entendimiento de estas vías es clave para el diseño de estrategias de prevención, diagnóstico temprano y tratamiento en cáncer y explican en parte la alta heterogeneidad fenotípica y genotípica de esta enfermedad.

1.5.- ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES EN PLASMA O SUERO (CNAPS)

Junto con la mejora del entendimiento de las bases moleculares del cáncer, en el manejo clínico oncológico se están realizando grandes esfuerzos para encontrar marcadores biológicos sensibles y específicos que permitan un diagnóstico precoz, así como una adecuada monitorización del tratamiento y determinación del pronóstico de la enfermedad cancerosa. Es bien conocido en la práctica clínica común, que diversos tumores son capaces de secretar seroproteínas al torrente circulatorio, como el CEA en el CCR, el PSA en el cáncer de próstata, la AFP en el hepatocarcinoma, el CA 15.3 en el cáncer de mama, el CA 19.9 en tumores pancreatobiliares, entre otros (43).

Sin embargo, no todos los tumores son capaces de secretarlas, por lo que las técnicas carecen de una adecuada sensibilidad, y pueden elevarse en procesos inflamatorios y enfermedades benignas, lo que también limita su especificidad diagnóstica. Además, para la mayoría de los tumores no hay marcadores séricos, por lo que su búsqueda aún perdura.

Hace varias décadas se demostró que los pacientes con cáncer tienen niveles más altos de ADN libre circulante en plasma y, más aún, que en ese ADN se pueden detectar las alteraciones propias del tumor (44), lo que constituye un reflejo intrínseco de la biología molecular de la neoplasia. Como hemos visto, algunos de estos cambios incluyen mutaciones, alteraciones de microsatélites, hipermetilación de genes supresores e integración genómica viral, entre otras.

La razón principal que ha llevado a profundizar en el estudio de los llamados “*Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*” (CNAPS) es el hecho de que en plasma y suero queden reflejados los cambios que acontecen en el tumor primario, lo que confiere a estas moléculas un extraordinario potencial como marcador clínico para diagnóstico y monitorización del cáncer (45) (Figura 5).

La presencia de los CNAPS no es un concepto nuevo, pero ha suscitado un notable y renovado interés por la comunidad científica en las últimas décadas. La existencia de ADN libre se reportó ya a mediados del siglo pasado por Mandel y Métais en 1948 (46),

pero pasaron 30 años hasta que este descubrimiento comenzó a mostrar su verdadero potencial. En 1977 León *et al.* demostraron que los pacientes con cáncer presentaban niveles basales más elevados de ADN libre que los individuos normales, y además, los pacientes con niveles persistentemente altos tras el tratamiento tenían peor pronóstico que aquellos en los que descendían (47). La sugerencia de que el ADN libre del suero o plasma derivaba del tumor primario se reportó años más tarde, en 1989 por Stroun *et al.* (48), pero la confirmación de estas hipótesis se produjo en dos estudios casi paralelos, donde se descubrió la presencia en sangre de mutaciones de *KRAS* en pacientes con neoplasias de páncreas y leucemia mielógena aguda respectivamente, demostrando que al menos una parte del ADN libre derivaba del tumor primario (49, 50). Estos hallazgos abrieron una importante vía para la investigación de los CNAPS como biomarcadores en diversos tumores.

Los CNAPS incluyen varias formas de ácidos nucleicos libres, tanto de ADN, como de ARN, ADN mitocondrial, ARN viral y microARN, descubierto con posterioridad (44, 51).

A pesar de los notables esfuerzos en la investigación, aún se desconocen aspectos importantes de la biología de los CNAPS, como los mecanismos de liberación (52, 53), formas en las que se encuentran en sangre (54-57), o cuál es su función biológica en la tumorigénesis o en el desarrollo de metástasis (58-63). Aspectos limitantes en el estudio de los CNAPS se producen por la falta de rigor en la uniformidad de las técnicas de laboratorio empleadas, la heterogeneidad de los tumores estudiados, así como el bajo número de pacientes reclutados, constituyendo para algunos autores un ejemplo de pobre traslación de la investigación básica a la práctica clínica (64).

Por tanto, es esperable que una mejora en el conocimiento de la biología de los CNAPS desemboque en un mejor diagnóstico y tratamiento del cáncer.

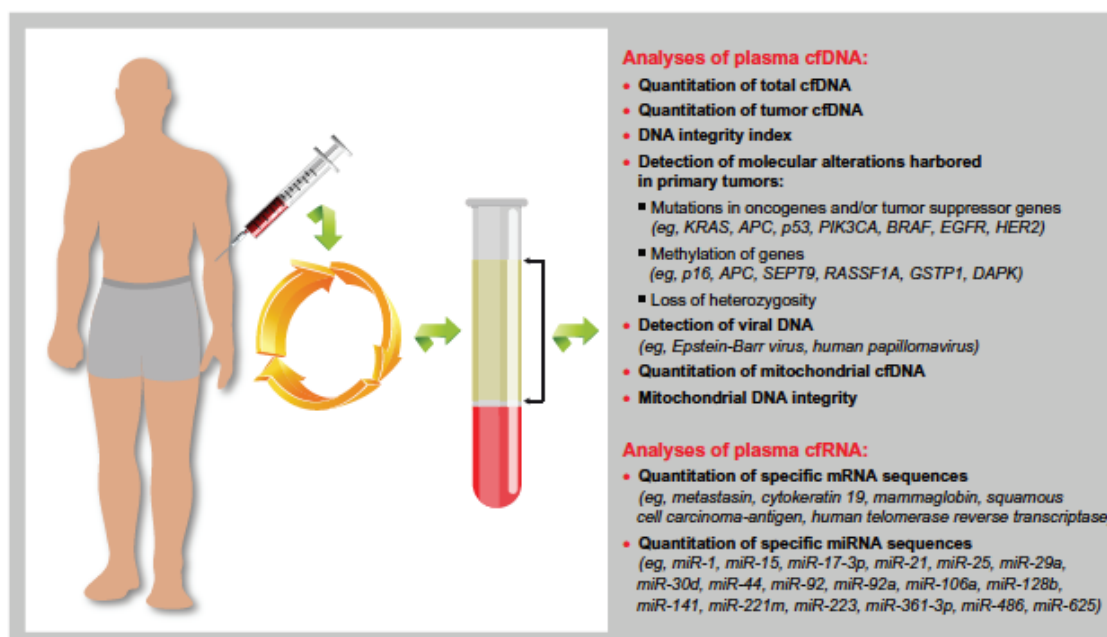


Figura 5: representación gráfica del análisis de los CNAPS en pacientes con cáncer y que podrían servir como marcadores clínicos.

Abreviaturas: mRNA, ARN mensajero; cfDNA, ADN circulante; cfRNA, ARN circulante; miRNA, microARN.

Fuente: González Masiá, JA, et al. *Oncotargets and therapy* 2013 Jul 8;6:819-32.

1.5.1- Biología del ADN libre circulante

Como se ha mencionado, el ADN libre puede ser genómico, mitocondrial o viral. Se ha descrito que el ADN circulante son moléculas de doble cadena con menor peso molecular que el ADN genómico, y presenta fragmentos cortos de entre 70-200 pares de bases y largos, de hasta 21 kilobases(65). Para algunos autores, la fuente principal de ADN circulante deriva de fenómenos de muerte celular, como la necrosis (66, 67). Otros autores consideran más probable su procedencia de fenómenos de apoptosis (68), en consonancia con los fragmentos más cortos detectados (65). Sin embargo, numerosos trabajos en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* sugieren también mecanismos de liberación activa celular (53, 68), tal vez mediados por los linfocitos de la sangre (69).

Por tanto, se barajan dos posibles fuentes de liberación, no necesariamente excluyentes: una “pasiva” a través de la muerte celular, bien por fenómenos de necrosis, apoptosis o ambos, y una “activa”, mediante un proceso de secreción celular.

Teóricamente, los CNAPS deberían ser rápidamente degradados en el torrente circulatorio por la acción de las nucleasas, e incluso se ha comprobado que el ADN libre mutado se degrada más rápidamente que el no mutado (70, 71). Sin embargo, la acción de estas enzimas se encuentra limitada, posiblemente debido a que parte del ADN libre circule protegido en complejos o partículas, cuyas características especiales le confieren una protección frente a la degradación enzimática (72-74). Además, se ha observado una disminución de la actividad enzimática ADNasa en pacientes con cáncer, interpretándose como otra razón para la elevación de los niveles de ADN circulante (75).

Con independencia del mecanismo o vehículo de transporte y aunque la liberación de CNAPS es un fenómeno ubicuo y constante (62, 76), el hecho de que se hallasen concentraciones elevadas en pacientes con cáncer ha motivado la investigación en su posible implicación oncogénica. Así, desde el punto de vista de su posible función algunos estudios han sugerido que los CNAPS tienen un efecto biológico pernicioso para las células sanas del organismo, y se han implicado en fenómenos tanto de envejecimiento como de progresión tumoral, lo que supone que el genoma somático podría estar sometido a la acción deletérea constante de los mismos (63). Estas teorías se sustentan en los hallazgos que demuestran la incorporación celular de estas moléculas mediante fenómenos de recombinación (61), por lo que podrían tener una actividad biológica que pueda ser relevante en la progresión del cáncer (58, 59, 61-63).

Sobre estas premisas se han cimentado diversas hipótesis que profundizan en la posible contribución de los CNAPS en el desarrollo y evolución de la enfermedad cancerosa, como por ejemplo la hipótesis de las Genometástasis, en la cual mediante un modelo experimental desarrollado en animales de laboratorio las metástasis podrían ocurrir a través de la transfección de células susceptibles localizadas en órganos diana a distancia mediante la transmisión y adquisición de oncogenes dominantes que derivarían del tumor primario y que circulan en plasma tras ser inoculadas en ratones desnudos inmunodeprimidos (59, 77)(Figura 6).

GENOMETÁSTASIS: De la Hipótesis a la Teoría

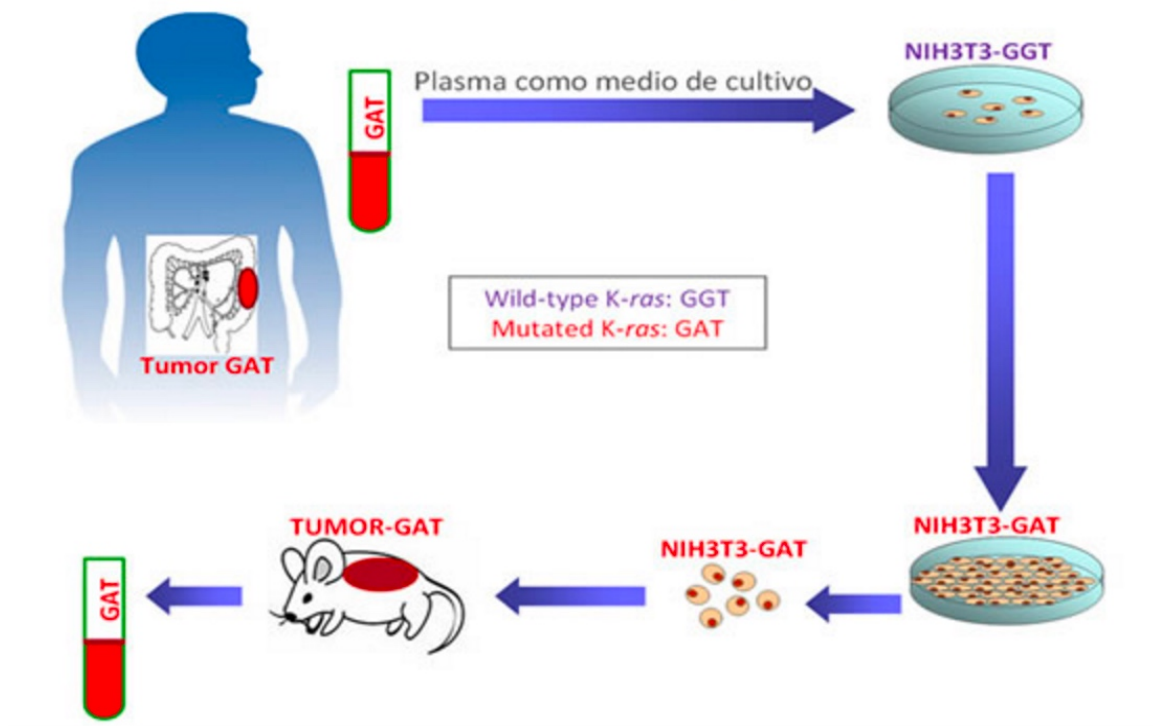


Figura 6: Teoría de la Genometástasis. Fuente: García-Olmo DC, et al. *Cancer Research* 2010 Jan 15;70(2):560-7

1.5.2.- Valor clínico del ADN plasmático en la enfermedad cancerosa

1.5.2.1.- Valor clínico de la cuantificación del ADN circulante

Múltiples estudios han corroborado los hallazgos iniciales de Leon *et al.*, que encontraron concentraciones elevadas de ADN circulante en plasma y suero de pacientes con distintos tipos de cáncer (44), como colon (78), pulmón (79-82), mama (83, 84), estómago (85) o esófago (86), entre otros .

Su importancia clínica en el diagnóstico del cáncer se puso de manifiesto en un amplio estudio sobre enfermedades gastrointestinales realizado por Shapiro (87), donde se mostraba una concentración media de ADN plasmático en pacientes con enfermedades gastrointestinales benignas de 118 ng/ml, frente a 412 ng/ml en pacientes con diferentes tipos de tumores malignos.

Sobre dichos hallazgos diversos artículos mostraron la posibilidad de usar la concentración de ADN plasmático como método de cribado de cáncer. Por ejemplo, en el CCR (78), para el que se ha reportado incluso mejor sensibilidad que la detección del CEA. También en el cáncer de mama (84), donde se relaciona con variables clínicopatológicas como el tamaño, estadio tumoral, adenopatías, grado y el estado Her2/neu; y en el cáncer de pulmón (81, 82), donde permite también estratificar el riesgo de los pacientes. Sin embargo, amplias revisiones ponen en duda su uso como marcador único (64), así como en otros estudios la cuantificación es desaconsejada, por ejemplo en cáncer de pulmón (88), o en el cáncer de ovario incluso asociado a CA125 (89). Puede comprobarse por tanto, que la utilidad clínica de estos métodos cuantitativos puede verse sesgada en parte por limitaciones de sensibilidad y especificidad en el laboratorio. A pesar de que se ha intentado establecer valores cuantitativos de referencia en distintos tipos de cáncer (90), la heterogeneidad en los métodos de cuantificación de laboratorio y el escaso número y ambigüedad de las cohortes de pacientes reclutados en los estudios, han mermado su poder estadístico imposibilitando establecer patrones de referencia, de forma que distintos estudios sobre el mismo tipo de tumor pueden presentar diferentes valores. Además, la detección también de niveles elevados de ADN plasmático en situaciones de estrés fisiológico (por ejemplo el ejercicio físico), trauma o sepsis (44, 91-93) ha cuestionado la especificidad de esta cuantificación para su uso en técnicas de cribado de enfermedades cancerosas.

Teóricamente la cantidad de ADN plasmático podría verse afectada por diversas variables clínicopatológicas como el tamaño tumoral, estadio, metástasis, agresividad, etc (64, 84), aunque para algunos autores no se ha demostrado una correlación lineal directa en el CCR (94). El grupo de García Olmo *et al.* ha elaborado estudios en modelos animales para profundizar en el conocimiento de la cinética del ADN circulante corroborando estos paradigmáticos hallazgos que demuestran un aumento en la concentración ya en fases precoces de la enfermedad, aspecto que sugiere la posibilidad de liberación de ADN no mutado por parte de las células vecinas en fases precoces del desarrollo tumoral, detectando así un incremento en la cantidad de ADN plasmático total (52, 95).

Donde la cuantificación del ADN plasmático puede mostrar su verdadero valor clínico es en la monitorización de la enfermedad (82, 96), ya que se ha mostrado cómo en pacientes con determinados niveles basales de ADN plasmático, éstos descienden en respuesta a tratamientos quirúrgicos (78, 80, 83, 85, 86), y/o quimioradioterápicos (96, 97), presentado niveles comparables a individuos sanos (80, 85, 86). Por contra, aquellos pacientes que mantienen niveles elevados se asocian a falta de respuesta al tratamiento, o bien si se incrementa durante el seguimiento puede predecir un aumento del riesgo de recaída de la enfermedad (47, 78-81, 83, 98).

Los **nucleosomas**, como productos de degradación de las células necróticas tumorales en el torrente circulatorio, también han sido ampliamente estudiados y cuantificados en los trabajos de Holdenrieder *et al.* por métodos de ELISA (73). El ADN de las células necróticas, tras ser engullidas por los macrófagos (67), es liberado a la sangre en el interior de estas estructuras. Constituyen un medio de vehiculización y protección de la actividad ADNasa. Demostrada la existencia de nucleosomas en pacientes sanos y enfermedades benignas (54), su valor como método de cribado queda limitado, pero su valor en la monitorización de la enfermedad cancerosa queda patente en diversos estudios, en los que se observó un incremento en el nivel de nucleosomas plasmáticos en función del aumento de la apoptosis por respuesta a tratamientos de quimioterapia y radioterapia, y un descenso final en sus niveles en pacientes que respondieron al tratamiento (54, 99, 100).

1.5.2.2.- Valor clínico de la detección del ADN tumoral

La detección de ADN libre tumoral en plasma requiere métodos altamente sensibles, ya que se trata de buscar estas alteraciones entre una gran cantidad de moléculas de ADN circulante normal. El desarrollo tecnológico con la llegada de técnicas de secuenciación masiva han propiciado la caracterización completa del genoma en distintos tipos de tumores (101) (Atlas del Genoma del Cáncer, 2012), desde la secuenciación completa (WGS: *Whole genome sequencing*), que conlleva una gran complejidad, pasando por métodos más selectivos como la secuenciación de exomas (WES: *whole exome sequencing*) o la secuenciación de un fragmento diana (TS: *targeted sequencing*) para detectar mutaciones somáticas en genes controladores

conocidos (102). La PCR digital se ha utilizado como método complementario a la secuenciación para la validación de los resultados y la cuantificación del ADN tumoral, y es esencial conocer a priori la alteración genética a determinar, lo que conlleva una mayor sensibilidad en comparación con las tecnologías de secuenciación masiva (103-106). Con la combinación de ambas técnicas se ha logrado tanto la selección como la validación de un gran número de alteraciones genómicas en el ADN circulante tumoral, incluyendo variantes mutacionales poco frecuentes.

Las alteraciones más frecuentemente analizadas en la literatura son las siguientes:

✓ **Mutaciones:**

Muchos estudios muestran que en el ADN plasmático pueden detectarse mutaciones propias del tumor primario. Por ejemplo de *KRAS*, o de genes supresores como *p53* o *APC*.

Las mutaciones del oncogen *KRAS*, que se dan en diversos tumores como colon, páncreas, pulmón y tiroides (64) son probablemente de las más referidas. Este gen como veremos más adelante, tiene características intrínsecas que lo hacen útil como marcador, pues tiene una prevalencia cercana al 50%, ocurre de forma precoz en el proceso de carcinogénesis, y las mutaciones más frecuentes se producen en un sitio muy concreto del genoma, en el codón 12, lo que hace más fácil la realización de técnicas de PCR para su detección (94).

Se ha reportado que las mutaciones en *KRAS* pueden ser detectadas en el plasma o suero de 25-30% de pacientes con CCR, dado que sólo afectan al 30-50% de los pacientes con este tipo de tumores (94), y el grado de correlación entre la detección de las mutaciones en plasma/suero y tejido tumoral no es perfecto. Por otra parte, en plasma se pueden detectar otras mutaciones diferentes a las detectadas en el tumor primario, lo que podría explicarse por la heterogeneidad clonal de los tumores (6, 107), o bien por la falta de sensibilidad o especificidad de algunas de las técnicas de laboratorio. Además, algunos autores han detectado mutaciones en hasta el 30% de

individuos sanos (64), lo que limita en este caso su papel diagnóstico como cribado del cáncer. Algunos autores recomiendan estos marcadores como elemento complementario a otros métodos cualitativos u otros marcadores séricos como el Ca19.9 en el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas (108), mientras que otros utilizan *KRAS* en la monitorización de la enfermedad (109).

En una de las series tempranas y más largas publicadas, se realizó un estudio de cribado en plasma de pacientes que iban a ser sometidos a colonoscopia; de esta forma trataron de correlacionar la detección de *KRAS* en plasma con los hallazgos clínicopatológicos detectados. Se identificó *KRAS* mutado en plasma del 83% en pacientes cuyos tumores también tenían mutaciones en ese gen. Además, observaron que determinados pacientes con colonoscopia a priori normal presentaron mutaciones de *KRAS* en plasma, lo que se explicó por la posibilidad de lesiones precancerosas, como criptas aberrantes en estadios muy precoces, sugiriendo la posibilidad de que la detección de ADN mutado en plasma sirviera como cribado previo a la detección de lesiones macroscópicas en la colonoscopia (87).

El valor clínico de las mutaciones de ADN plasmático en la monitorización de la respuesta al tratamiento en el CCR queda patente en diversos estudios realizados en pacientes sometidos a cirugía y quimioterapia (96). En este sentido, otros estudios emplearon paneles con las mutaciones más frecuentes en el CCR (*APC*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA* y *BRAF*) para la monitorización y respuesta al tratamiento (110). También en el postoperatorio, la cuantificación en suero de mutaciones en *KRAS* fue empleado como predictor de recurrencia (111).

Uno de los aspectos más relevantes en la detección de mutaciones es que muchos agentes quimioterápicos actúan en las vías de acción de mediadas por los genes *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* o *p53* (112, 113). La detección de estas mutaciones en plasma constituye una buena forma de predecir la respuesta al tratamiento y de monitorizar la enfermedad. Así, la detección de mutaciones de *EGFR* en plasma puede ser útil en la predicción de progresión, intervalo libre y resistencia a drogas en pacientes con cáncer. Por tanto, los pacientes que presenten mutaciones específicas en el tumor primario pueden ser candidatos para la monitorización en sangre de su respectiva mutación mediante el ADN plasmático tumoral (98, 106, 114, 115).

✓ Integridad de la cadena de ADN

Basándose en las características de los fragmentos liberados por la células tumorales, y asumiendo que la mayor parte del ADN plasmático procede de fenómenos de necrosis, Wang *et al.* observaron que mediante PCR podían diferenciar los fragmentos largos de ADN, más propios de fenómenos de necrosis tumoral, frente a fragmentos más cortos, procedentes de fenómenos de apoptosis fisiológica (116). Estos hallazgos dieron origen al concepto de “*integrity index*”, basado en el cociente entre fragmentos largos/cortos de ADN. En dicho estudio se sugería que la integridad de cadena proporcionaba una forma simple y barata de detección del cáncer (116).

Algunos de los trabajos más citados acerca del valor diagnóstico de la integridad del ADN plasmático son los de Umetani en cáncer CCR y periampular, y de mama (117, 118). Concretamente observaron incrementos del “*integrity index*”, incluso en fases muy tempranas de la enfermedad. Además, en el cáncer de mama permitió detectar con gran sensibilidad las metástasis linfáticas de forma precoz, con mayor valor predictivo que las variables clínicopatológicas más comúnmente usadas como el tamaño tumoral, estadio, etc (118).

En otros estudios se ha mostrado el valor de este índice, no sólo en el diagnóstico, sino en la monitorización de la enfermedad, observándose un descenso del “*integrity index*” en respuesta a tratamientos quirúrgicos en tumores de cabeza y cuello (119) o melanoma (120), quimioterápicos en leucemia (121) o radioterápico en tumores nasofaríngeos (122).

A pesar de que en algún estudio no se ha podido confirmar su validez diagnóstica (85, 100), otros autores destacan el valor clínico del “*integrity index*” y consideran que reúne muchas características para convertirse en un biomarcador universal (114).

✓ **Hipermetilaciones**

Como se ha visto anteriormente, en los fenómenos de tumorigénesis y progresión tumoral se encuentran determinadas alteraciones epigenéticas, como las metilaciones.

Un aspecto muy importante para detectar este fenómeno es seleccionar adecuadamente los genes relacionados con el tumor para mejorar la sensibilidad de los estudios por PCR (114). Este hecho es importante porque, aunque las alteraciones epigenéticas no son únicas para un solo tumor, hay ciertos genes frecuentemente hipermetilados y silenciados en cada uno de los distintos tipos de tumores, hecho que permite utilizar paneles de detección para aumentar la sensibilidad (123-125).

Algunas de las metilaciones aberrantes más frecuentes afectan al gen supresor *p16* en pacientes con cáncer de hígado, pulmón y mama (126). Otros genes supresores frecuentemente hipermetilados son *APC*, *SEPT9*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *DAPK*, entre otros. Para mejorar el diagnóstico pueden usarse en combinación con la cuantificación del ADN plasmático mutado, por ejemplo en el CCR (127). El valor clínico de su detección en plasma queda reflejado en distintos tipos de tumores como el de mama (124, 125), colon (127), hígado (128), esófago (129), tumores urológicos (130), enfermedades hematológicas (131), etc., que permite su utilización como herramienta de estratificación de riesgo, y predicción de respuesta a ciertos tipos de quimioterapia (64, 114, 132), así como también como predictor de recaída e intervalo libre de enfermedad (127-129).

✓ **Inestabilidad de microsatélites (IMS)**

Se ha detectado MSI en múltiples tipos de tumores, sin embargo, existen discrepancias entre los hallazgos del tumor y los hallazgos en el ADN plasmático (44). Ésto, junto con el hecho de que haya diferentes microsatélites inestables en un mismo tipo de tumor hace que a veces se cuestione su utilidad como biomarcadores. No

obstante, algunos autores han sugerido su posible uso en diagnóstico precoz en cáncer de mama (133) y para algunos, tiene mayor sensibilidad diagnóstica que otras alteraciones del ADN plasmático en ciertos tipos de tumores, como los de ovario (89).

Suelen usarse paneles de varios microsatélites para aumentar su sensibilidad (134, 135). Así, por ejemplo, en un estudio prospectivo de cáncer de mama, en el que determinaron un panel de 8 marcadores plasmáticos y observaron correlación con estadio tumoral, tamaño, metástasis linfáticas ganglionares, receptor de progesterona y el receptor HER2. Lo más importante es que la detección de estos microsatélites en plasma proporciona importante información sobre el silenciamiento de genes supresores tumorales como *BRCA1* y sobretodo *Cyclin D2*, lo que se correlacionó con peor supervivencia media (135). En ocasiones, para aumentar la sensibilidad de los marcadores, se combinan varios microsatélites con otros marcadores como metilaciones y PSA en cáncer de próstata (136).

La detección de inestabilidad de microsatélites en plasma podría usarse también para monitorizar la respuesta al tratamiento en diversos tipos de cáncer, como en el cáncer de mama (137), carcinoma oral (134) y en la respuesta a la quimioterapia en el melanoma metastásico (138).

1.5.2.3.- Valor clínico de la detección de ADN viral

Determinados virus son considerados factores etiológicos principales de distintos tipos de tumores, y son detectados normalmente por técnicas de PCR. Así, se ha demostrado la presencia de ADN plasmático de virus de Epstein-Barr (EBV), en cánceres nasofaríngeos, enfermedad de Hodgkin y linfoma Burkitt; el virus del papiloma humano (VPH) en tumores cervicales, de cabeza y cuello ; el virus de la hepatitis B (VHB) en tumores hepatocelulares, gástricos y ciertos linfomas (44, 114, 126, 139-143).

Uno de los virus más estudiados por la alta incidencia de carcinoma nasofaríngeo en países asiáticos es el EBV. Se ha demostrado que su detección en plasma es una poderosa herramienta de diagnóstico y pronóstico (143), y se ha relacionado también con el grado de respuesta a la radioterapia, recurrencia de la enfermedad y supervivencia (126).

1.5.2.4.- Valor clínico del ADN mitocondrial

Aunque las alteraciones genéticas y epigenéticas en el genoma nuclear constituyen la piedra angular del estudio del cáncer, desde el descubrimiento de alteraciones específicas en el ADN mitocondrial en pacientes oncológicos (144), la monitorización de estos cambios aberrantes se están convirtiendo en una herramienta cada vez más importante en el diagnóstico precoz del cáncer, por sus ventajas sobre los métodos basados en el genoma nuclear (145). Estas ventajas pueden resumirse en las siguientes:

- El genoma mitocondrial es más corto y presenta una organización más simple. Estas propiedades únicas hacen que sea mucho más fácil y efectivo en el cribado que el uso del ADN genómico.
- El alto número de copias en comparación con el ADN nuclear hace que sea un método mucho más sensible.
- Los fragmentos de ADN mitocondrial han sido detectados en distintos fluidos corporales como sangre periférica (144, 146), saliva (147), orina (148) o esputo de pacientes en estadios precoces de distintos tipos de tumores.

Las alteraciones en el ADN mitocondrial como respuesta a cambios adaptativos en su entorno y su relación con el cáncer es ampliamente conocida desde las primeras décadas del siglo XX, en lo que conoce como "efecto Warburg" (149). Las alteraciones mitocondriales han sido detectadas en plasma de individuos sanos (150), y también han demostrado tener un papel importante en el desarrollo y la progresión tumoral (151).

Pueden resumirse en: mutaciones puntuales, delecciones, inserciones y cambios cuantitativos (145), y han sido identificadas ampliamente en tumores de mama, colon, hígado, cabeza y cuello, pulmón, y otros tejidos (152). Posteriormente, diversos autores han detectado la presencia de estas mutaciones en plasma o suero relacionadas con tumores hepatocelulares, páncreas, próstata, CCR, entre otros (153-156). Es importante resaltar el descubrimiento de mutaciones en una región puntual característica en muchos tipos de tumores llamada "D-loop", que podría tener valor diagnóstico (144).

Diversos estudios destacan el valor diagnóstico de su detección en suero o plasma comparándolos con el ADN genómico circulante. Kohler *et al.*, utilizando PCR cuantitativa, comparó los niveles plasmáticos de ADN nucleico y mitocondrial en pacientes con tumores benignos y malignos de mama, observando que ambos tipos de determinaciones son capaces de diferenciar entre enfermedad benigna y maligna, destacando la capacidad del ADN mitocondrial como biomarcador (157). Zachariah *et al.* realizó un estudio sobre 104 mujeres comparando los niveles de ADN genómico circulante y mitocondrial en mujeres con cáncer de ovario, tumores benignos o endometriosis. Observaron que el ADN genómico circulante, de forma general, no se relacionaba con las variables clínicopatológicas ni con el CA125 sérico, sin embargo, el ADN mitocondrial era el único con capacidad para discriminar entre pacientes con cáncer de ovario y con endometriosis (158).

Otros estudios han utilizado la cuantificación del ADN mitocondrial y el denominado “*mitDNA-integrity*” (definido como el cociente entre fragmentos largos/cortos de ADN mitocondrial) para discriminar entre pacientes con tumores urológicos renales, de próstata y vejiga, relacionándose también con diversas variables clínicopatológicas (159).

1.6.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Desde que se comprobó la presencia en el torrente circulatorio de elevadas concentraciones de ADN y posteriormente la posibilidad de detectar alteraciones genéticas y epigenéticas propias del proceso carcinogénico (47), se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a explorar el potencial clínico de este fenómeno como marcador molecular en el cáncer. Actualmente el diagnóstico de la mayor parte de los tumores sólidos se fundamenta en el análisis histopatológico de la pieza tumoral, y se complementa con el uso de marcadores tumorales séricos, que presentan importantes limitaciones en su sensibilidad y especificidad. Por ello, en este particular es especialmente relevante en la investigación clínica la búsqueda de nuevos biomarcadores que establezcan un diagnóstico más precoz, selección de poblaciones de riesgo que requieran métodos diagnósticos más sensibles y específicos de cribado, permitan una adecuada gestión de las estrategias terapéuticas, así como una monitorización de la respuesta y un diagnóstico precoz de las recidivas para establecer técnicas precoces que mejoren el pronóstico (94, 160-167). El CCR es un caso paradigmático a este respecto, tanto por su importancia epidemiológica, como por la creciente complejidad en la gestión de su manejo diagnóstico y terapéutico.

El potencial valor clínico del ADN circulante en el CCR es un aspecto considerablemente estudiado en la literatura. Con el foco en distintos aspectos relevantes, por una parte se han elaborado estudios que han indagado en el valor diagnóstico de la detección y cuantificación del ADN circulante para el cribado del cáncer mediante el estudio comparativo sobre grupos control de individuos sanos sometidos a estudios colonoscópicos (87). También se ha estudiado su relación con respecto a diversas variables clínicopatológicas que atañen a la estadificación tumoral. Sin embargo, en ambos casos la falta de valores de referencia precisos se ha puesto de manifiesto, tanto por la heterogeneidad metodológica de los estudios como por la dificultad en la selección de valores de corte, que según se establezcan verán inversamente alterados los valores de sensibilidad y especificidad diagnósticos y que impiden una adecuada caracterización de la enfermedad cancerosa (44, 64). También se ha estudiado su valor pronóstico asociado como factor de riesgo independiente de *DFS* (del inglés -“disease free survival”-) y *OS* (del inglés -“overall survival”-) (64, 127,

168-170), y han tratado de establecer una correlación directa entre los valores de cuantificación general de ADN circulante o en la detección de mutaciones plasmáticas *KRAS* con el *DFS* y *OS* (171).

Por último, y donde reside un mayor riqueza bibliográfica es en la utilización de la dinámica del ADN circulante para monitorizar la respuesta de pacientes sometidos a tratamientos quirúrgicos (96, 172) y/o quimioterápicos (85, 86, 97, 127, 168, 169, 173-175), como también en el estudio de su valor predictivo de respuesta al tratamiento.

En conclusión podemos resumir que la utilización del ADN circulante como biomarcador en el CCR además de su valor clínico tiene varias ventajas potenciales, como la posibilidad de ser medido por técnicas no invasivas, rápidas y de bajo coste. Además permiten la caracterización molecular tanto del tumor primario como de las posibles metástasis, pues el ADN circulante proporciona representación de todos los sitios del tumor, y por tanto aporta información de todos los eventos moleculares destacados del proceso de tumorigénesis (161). Se establece así como una auténtica "biopsia líquida" capaz potencialmente de solventar los problemas derivados de la heterogeneidad molecular no solo intratumoral, sino también en las diferentes localizaciones de la enfermedad, poniendo de manifiesto los cambios a nivel genómico, epigenómico y transcriptómico que se producen a lo largo de la evolución del cáncer en el individuo (33, 94, 114, 160). Estos argumentos lo podrían convertir en una herramienta indispensable y eficaz para establecer medidas oncológicas más específicas, al analizar el genotipo del tumor en tiempo real e identificar mutaciones relevantes que no son detectadas con la biopsia de tejidos, y que se producen durante el transcurso de la enfermedad. Se posibilita dar un paso más hacia la medicina personalizada mediante la terapia oncológica dirigida, como ya ocurre en la práctica clínica habitual con la detección de mutaciones de *KRAS* en tumores para la toma de decisión en el tratamiento con quimioterápicos basados en anticuerpos monoclonales anti-EGFR del inglés- *endotelial growth factor receptor*-) (33).

Sin embargo, la biopsia líquida todavía hoy tiene, además de algunas limitaciones clínicas algunos interrogantes por resolver, como la posibilidad de que no todos los tumores liberan una cantidad suficiente de ADN a la circulación sanguínea que facilite su detección, así como la imposibilidad de asignar un genotipo específico para cada

tumor particular, especialmente en pacientes con múltiples metástasis (33), por citar algunas de las más importantes.

Basado en estos aspectos y a pesar de sus limitaciones esta biopsia líquida se ha erigido como una herramienta clínica que ha permitido avanzar en el diagnóstico y monitorización de la enfermedad cancerosa, que además podría estar implicada biológicamente en la progresión tumoral y en el desarrollo de metástasis, podría eventualmente sustituir las muestras de tejido tumoral y ser una herramienta clave en la planificación las estrategias terapéuticas adyuvantes del CCR. De la mano del desarrollo e innovación tecnológica actual es esperable nuevos avances que reporten un incremento de su utilidad clínica y una mayor implementación en el terreno de la oncología y más concretamente en el CCR.

En consecuencia, dado el posible valor de los CNAPS en la biología tumoral y para explorar su potencial valor clínico en nuestro trabajo nos propusimos analizar los niveles de ADN plasmático total y tumoral en el CCR en el perioperatorio inmediato en cuanto a su valor diagnóstico y pronóstico mediante el empleo de distintos métodos de cuantificación, e indagamos en la posible relación de la detección de ADN plasmático tumoral en la monitorización de la respuesta al tratamiento con la exéresis quirúrgica del tumor primario.

2.- OBJETIVOS

1.- En pacientes de cáncer de colon, valorar la utilidad diagnóstica -en el estadiaje tumoral- y pronóstica, de la cuantificación de ADN plasmático total mediante tres técnicas: PCR cuantitativa en tiempo real, fluorimetría y espectrofotometría.

1.1. Comparar la utilidad de estas técnicas entre sí.

2.- En pacientes de cáncer de colon con mutaciones en el gen *KRAS*, valorar la utilidad diagnóstica -en el estadiaje tumoral- y pronóstica de la detección de ADN plasmático mutado, mediante PCR en tiempo real.

3.- Evaluar el efecto de la exéresis quirúrgica tumoral de colon sobre los niveles de ADN plasmático total y tumoral en el postoperatorio inmediato.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS CONCEPTUAL

El análisis del ADN libre circulante en plasma no es útil para el estadiaje tumoral en el momento del diagnóstico de cáncer de colon esporádico, pero sí puede tener un valor pronóstico predictivo.

HIPÓTESIS OPERATIVAS

- ❖ Los niveles de ADN plasmático total no se relacionan con el estadio tumoral.
- ❖ La detección de ADN plasmático tumoral no se relacionan con el estadio tumoral.

- ❖ La variación en los niveles de ADN plasmático total entre el pre y el postoperatorio de la exéresis quirúrgica tumoral, tiene valor predictivo pronóstico.

HIPÓTESIS ESTADÍSTICAS

-Hipótesis nula: en pacientes de cáncer de colon sometidos a tratamiento quirúrgico, los niveles de ADN plasmáticos no cambian con la exéresis tumoral, ni tienen valor pronóstico.

-Hipótesis alternativa: en pacientes de cáncer de colon sometidos a tratamiento quirúrgico, los niveles perioperatorios de ADN plasmático tienen valor predictivo pronóstico.

3.- PACIENTES Y MÉTODOS

3.1.- SUJETOS DE ESTUDIO

El grupo de estudio se integró por pacientes diagnosticados y tratados quirúrgicamente de CCR, según los protocolos de actuación del Servicio de Cirugía General del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA), dentro del área de cobertura sanitaria de dicho Centro (población aproximada de 400.000 habitantes). Los pacientes se reclutaron de forma consecutiva durante 3 años, comenzando en mayo de 2012. Asimismo, se emplearon muestras biológicas de pacientes diagnosticados con anterioridad y almacenadas en el Biobanco del CHUA.

3.1.1.- Criterios de inclusión

- 1.- Pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de colon que fueron intervenidos en el CHUA, y de los cuales pudo obtenerse muestras sanguíneas y de tejidos tumorales para confirmación histopatológica del tumor.
- 2.- Pacientes que, cumpliendo los requisitos legales generales (mayoría de edad, no incapacidad, etc), firmaron los consentimientos informados para poder trabajar y procesar sus muestras biológicas en el laboratorio.

3.1.2.- Criterios de exclusión

- 1.- No cumplir alguno de los criterios de inclusión.
- 2.- Pacientes con problemas graves de coagulación que impidieran el normal procesamiento de las muestras plasmáticas.
- 3.- Haber estado expuesto en los 30 días previos a la intervención cualquier tipo de tratamiento antitumoral.
- 4.- Localización rectal del tumor.
- 5.- Presentar durante la realización del estudio algún proceso neoplásico activo diferente del propio CCR.

3.1.3.- Consideraciones éticas

Todas las muestras obtenidas para el estudio pasaron a formar parte del Biobanco del CHUA, al que se solicitó formalmente autorización para la colaboración en el inicio del proyecto. A todos los pacientes reclutados para el estudio se les informó verbalmente y por escrito del objetivo de la toma de muestras para la investigación, garantizándoles la confidencialidad y voluntariedad del mismo, y solicitándoles la firma del modelo de consentimiento informado adoptado por el Biobanco del CHUA, así como un consentimiento específico del estudio.

3.2.-OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PROCESAMIENTO INICIAL

Los procedimientos para extracción de muestras biológicas fueron previamente valorados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del CHUA. El esquema general de desarrollo del trabajo queda reflejado en la figura 7.

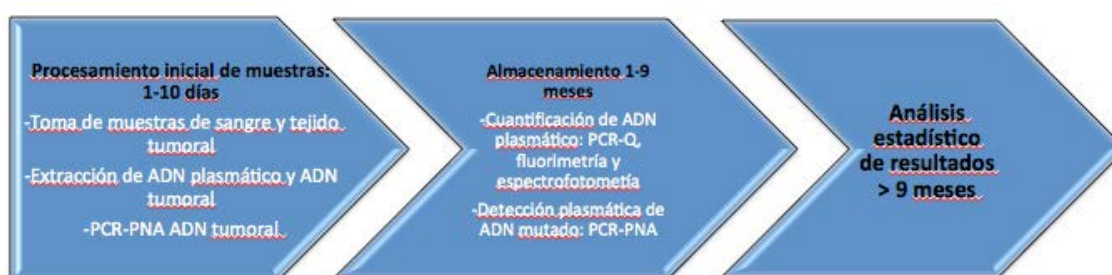


Figura 7: esquema temporal de desarrollo del estudio.

3.2.1.- Muestras sanguíneas: se recogieron dos muestras sanguíneas de cada paciente. La primera fue en el preoperatorio, es decir, durante las 24 h previas a la intervención quirúrgica. La segunda fue en el postoperatorio inmediato, periodo que comprende los 7-10 días posteriores a la intervención previo al alta hospitalaria, siempre que no hubiera ninguna complicación médica o postquirúrgica activa, en cuyo caso se recogían las muestras cuando dicha situación proinflamatoria hubiera cesado en las determinaciones clínicas y analíticas. Las muestras eran recogidas en 3 tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), a razón de 10 ml por tubo.

Por tanto, el volumen de partida de las muestras sanguíneas fue de 30 ml, que se sometió a dos centrifugaciones consecutivas. La primera fue de 10 minutos a 1.800 g. Se recogió el plasma con cuidado de no arrastrar el sedimento, y se sometió a la segunda centrifugación durante 10 minutos a 3.000 g, recogiendo de nuevo el plasma con la misma precaución (figura 8).

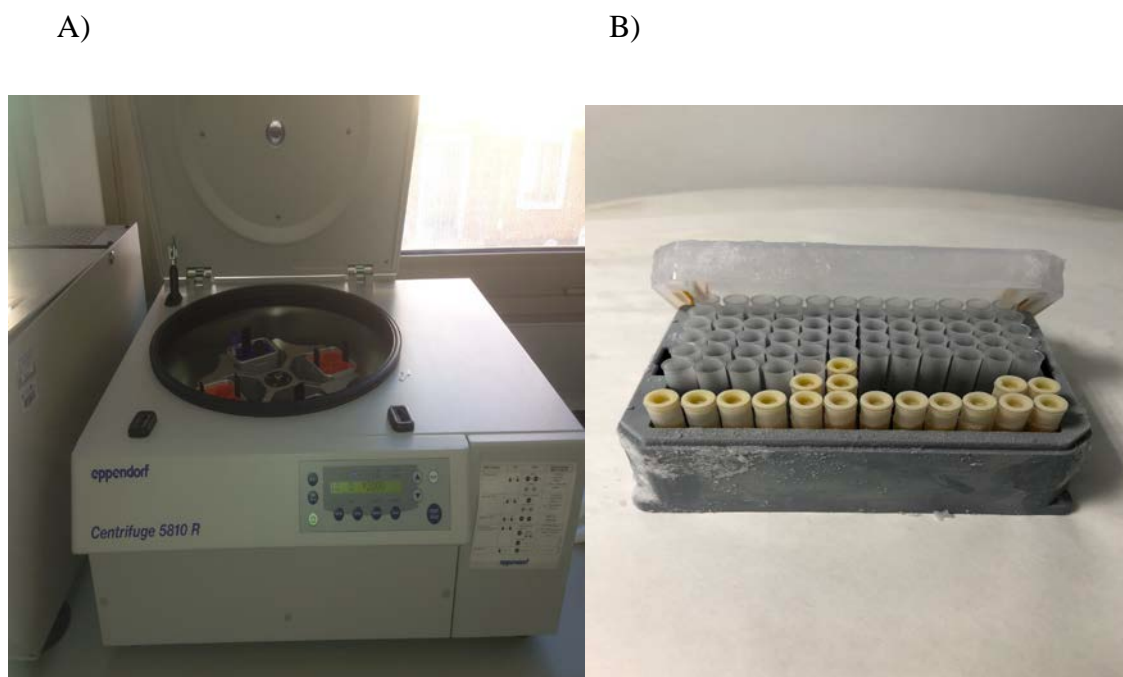


Figura 8. A) Centrífuga empleada para el procesamiento de muestras. B) Gradilla de congelación de muestras.

El plasma obtenido se alícuotó a razón de 1,1 ml en microtubos de 1,5 ml. Las alícuotas destinadas a la realización inmediata de PCR se almacenaron a 4°C, y se utilizaron en un plazo máximo de 72 horas. El resto se almacenaron a -80°C para su posterior análisis por otros métodos.

3.2.2.- Muestras de tejidos tumorales: las muestras de tumores primarios se recogieron en fresco durante la intervención quirúrgica, e inmediatamente se remitieron al Servicio de Anatomía Patológica del CHUA. Tras la valoración macroscópica y de forma previa al tallado para el diagnóstico histopatológico y estadificación del tumor, se

destinó una parte al Biobanco, que se congeló a -80°C, y de la cual obtuvimos muestra para el presente estudio.

3.2.3.- Recogida de datos, variables clínicas y seguimiento

Todos los datos y variables clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se extrajeron de la entrevista clínica realizada en la consulta de Cirugía General previa a la intervención quirúrgica, así como de los informes existentes en el historial médico de cada paciente, reflejados en la estación clínica informática implantada en el CHUA, denominada "Mambrino XXI".

El seguimiento clínico de los pacientes se llevó a cabo mediante las entrevistas clínicas periódicas realizadas igualmente en las consultas de Cirugía General, así como de Oncología Médica, utilizando los medios complementarios diagnósticos habituales (analítica con marcadores tumorales, pruebas de imagen, colonoscopia, etc) para objetivar la evolución, complicaciones a medio y largo plazo, recidiva, tratamiento complementario, exitus, etc. Para su consulta se utilizaron los datos reflejados en la estación clínica informática "Mambrino XXI" del CHUA.

En la recogida de datos se diseñó una base empleando el programa Excel 2015 v.12.3, donde se recogieron los datos de filiación (nombre y apellidos, número de historia clínica, fecha de nacimiento), datos clínicos (diagnóstico, localización del tumor, complicaciones, tratamiento adyuvante, etc), estadificación (TNM, grado de diferenciación), gestión de la colección de los tejidos tumorales y de la seroteca (fecha de recogida, cantidad de muestra, concentración de ácidos nucleicos) y evolución de los pacientes (recidiva, metástasis, exitus).

Finalizado el periodo de recogida de muestras y análisis de laboratorio, los datos fueron posteriormente codificados, tabulados e incorporados a la base de datos para su análisis estadístico posterior, para lo cual se utilizó el paquete estadístico SPSS v.23.

3.3.- EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1.- Extracción de ADN de tumores

La extracción de ADN de tumores primarios se realizó mediante el "kit" comercial específico de tejidos denominado “DNeasy Blood and Tissue” (Qiagen®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procederá a la combinación de 25 gramos de muestra de tejido tumoral procedente del biobanco del CHUA con los diferentes reactivos que aporta el "kit" en el interior de columnas de sílica (figura 9), y posteriormente se someterán a varias fases de centrifugación para obtener el eluido, todo ello siguiendo las instrucciones del fabricante según el protocolo de extracción y purificación de ADN. El volumen de elución final fue de 200 µl.

Se hicieron cuatro alícuotas de cada ADN extraído. Una se mantuvo a 4°C, mientras se realizaban los análisis por PCR, mientras el resto se conservaron a -20°C.

3.3.2.- Extracción de ADN de plasmas

La extracción de ADN de muestras de plasma de los pacientes con CCR se realizó mediante el "kit" comercial específico de plasmas denominado “QIAamp DNA Blood Midi Kit” (Qiagen®, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se procederá a la combinación de las muestras de plasma con los diferentes reactivos que aporta el "kit" en el interior de columnas de sílica (figura 9), y posteriormente se someterá a varias fases de centrifugación para obtener el eluido, todo ello siguiendo las instrucciones del fabricante para la obtención de muestras biológicas. El volumen de partida de las muestras de plasma fue 1 ml. El volumen de elución final fue de 150 µl.



Figura 9: columnas de sílica empleadas para la extracción de ADN de las muestras de tumores y plasmas.

Se hicieron alícuotas de cada ADN extraído. Se conservaron a -20°C si se usaron para los análisis en un plazo inferior a un mes, o a -80°C si se excedía dicho plazo.

3.4.- DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE *KRAS* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

3.4.1.- Detección de secuencias de *KRAS* mutado en muestras de tumores

La técnica que se empleó para detectar mutaciones en el codón 12 del exón 1 del gen *KRAS* humano se basó en el uso de oligómeros ácido péptido nucleicos o sondas PNA (del inglés, *Peptide Nucleic Acid*), combinados con sondas de hibridación denominadas FRET (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), en el sistema de PCR cuantitativa en tiempo real denominado “LightCycler” de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), utilizando la versión 4.0 de su software (figura 10).

La sonda PNA fue sintetizada por Panagene (Daejeon, Corea del Sur) y es una molécula complementaria a los codones 10 a 14 del exón 1 del gen *KRAS*. Se añadió para inhibir la amplificación de las secuencias no mutadas de dicho gen, y su secuencia se muestra en la Tabla 2. Estas sondas son análogos artificiales de ADN, en los que el anillo ribosa-fosfato del ADN es sustituido por una estructura de poliamida. A pesar de este cambio radical estructural, y debido a su estructura química, estas sondas son

capaces de unirse a secuencias complementarias de ADN de manera muy específica (Figura 10). Se muestra un esquema de actuación del sistema FRET-PNA (Figura 11).

Utilizando esta técnica, se examinó la presencia de tres tipos de mutación:

- Gly12Asp (GGT→GAT).
- Gly12Cys (GGT→TGT).
- Gly12Val (GGT→GTT).

Se utilizaron dos cebadores que amplificaban un fragmento genómico de 164 pares de bases (pb), específico del exón 1 del gen *KRAS*. Las secuencias de los cebadores fueron sintetizados por Bonsai Technologies Group, S.A (Madrid, España). Se utilizaron dos sondas de hibridación para cada amplificación, denominadas “sensor” y “anclaje”. La sonda “sensor” fue diseñada para ser complementaria a la mutación puntual de interés en el gen *KRAS*, marcada con el fluoróforo LC-Red705 (longitud de onda de emisión: 705 nm) en el extremo 5′, y fosforilada en el extremo 3′, para evitar su extensión por la Taq ADN polimerasa. La sonda de “anclaje” se marcó con fluoresceína (Flu; longitud de onda de emisión: 525 nm) en el extremo 3′, y su secuencia fue la misma en todos los casos. Las secuencias de las sondas “sensor” se muestran en la tabla 6. Las sondas fueron sintetizadas por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).

En cada muestra se realizó en primer lugar una PCR con la sonda específica para la mutación Gly12Asp, ya que era la más frecuente. Si no resultaba positiva o la señal era débil, se probaban las otras dos. Si no había señal fluorescente con ninguna de las 3 sondas, se consideraba que el tumor no tenía mutaciones en el codón 12 de *K-RAS*.

Para todas las PCR, se utilizó el “kit” denominado “LightCycler Fast Start DNA MasterPLUS Hyb Probes” de Roche Diagnostics, que contenía la enzima Taq ADN polimerasa, tampón de reacción, MgCl₂ y desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). La mezcla de reacción tenía un volumen total de 20 µl, conteniendo 1 µM de cada cebador, 0,4 µM de cada una de las sondas fluorescentes, 2 µM de sonda PNA, 2 mM MgCl₂ (Biotools B&M Labs, S.A), 1 Ude Taq ADN Polimerasa (Biotools B&M Labs, S.A) y un mínimo de 55 ng de ADN en un volumen de 2 µl.

NOMBRE	SECUENCIA
Cebador "forward" (5'--> 3')	aaggcctgctgaaaatgactg
Cebador "reverse" (5'--> 3')	ggctcctgcaccagtaatatgca
Sonda "sensor" - GAT	LC-Red705-ttgctacgccATCagctccaa-P
Sonda "sensor" - TGT	LC-Red705-ttgctacgccACAagctccaa-P
Sonda "sensor" - GTT	LC-Red705-ttgctacgccAACagctccaa-P
Sonda "anclaje"	cgccacaaaatgattctgaattagctatcgtaaggcact-Flu
Sonda PNA	NH-cctacgccaccagctcc-CONH

Tabla 6. Secuencias de los cebadores, sondas FRET y sonda PNA utilizados en los análisis por PCR en tiempo real. Flu: fluoresceína; LC-Red 705: Fluoróforo denominado LightCycler-Red 705; P: grupo fosfato; PNA: Peptide Nucleic Acid.

En cada PCR se añadió a la mezcla de reacción 1 µl de la enzima Uracil-ADN-glicosilasa (Roche Diagnostics), para evitar contaminaciones por productos amplificados.

En todas las PCR se incluyeron muestras de ADN procedentes de tumores con secuencias conocidas de *KRAS* como controles positivos, y agua como control negativo.

Los ciclos de temperatura se programaron de la siguiente forma: 10' a 95°C, para activar a la enzima y producir la desnaturalización del ADN, seguido de 50 ciclos de 2'' a 95°C, 10'' a 70°C, para la unión de la sonda PNA, 7'' a 60°C, para el anillamiento de los cebadores y las sondas FRET, y 15''' a 72°C. La fluorescencia fue detectada en el canal F3/F1 del sistema, siendo F3 el canal que detecta la emisión de fluorescencia de LC-Red 705 (longitud de onda de emisión: 705 nm) y F1 el canal que detecta la emisión de la fluoresceína (longitud de onda de emisión: 525 nm), y analizada en el canal F3/back-F1 del sistema. Este canal es específico para el análisis con sondas de hibridación, utilizando LC-Red 705. Se resta la emisión de la fluoresceína porque, aunque se utiliza como fluoróforo excitador, no es la detección de su fluorescencia lo que interesó para el estudio.



Figura 10: LightCycler de Roche. Aparato y software empleados para la realización de las PCR.

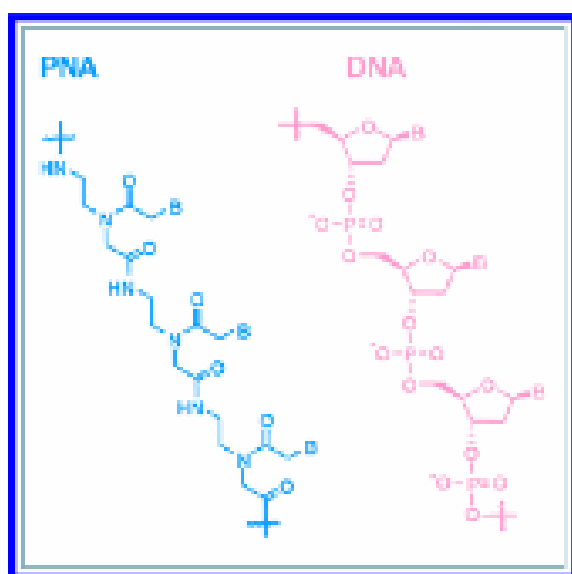


Figura 11: comparación de la estructura química de la sonda PNA y una molécula de ADN. Fuente: Domínguez Berzosa C. (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.

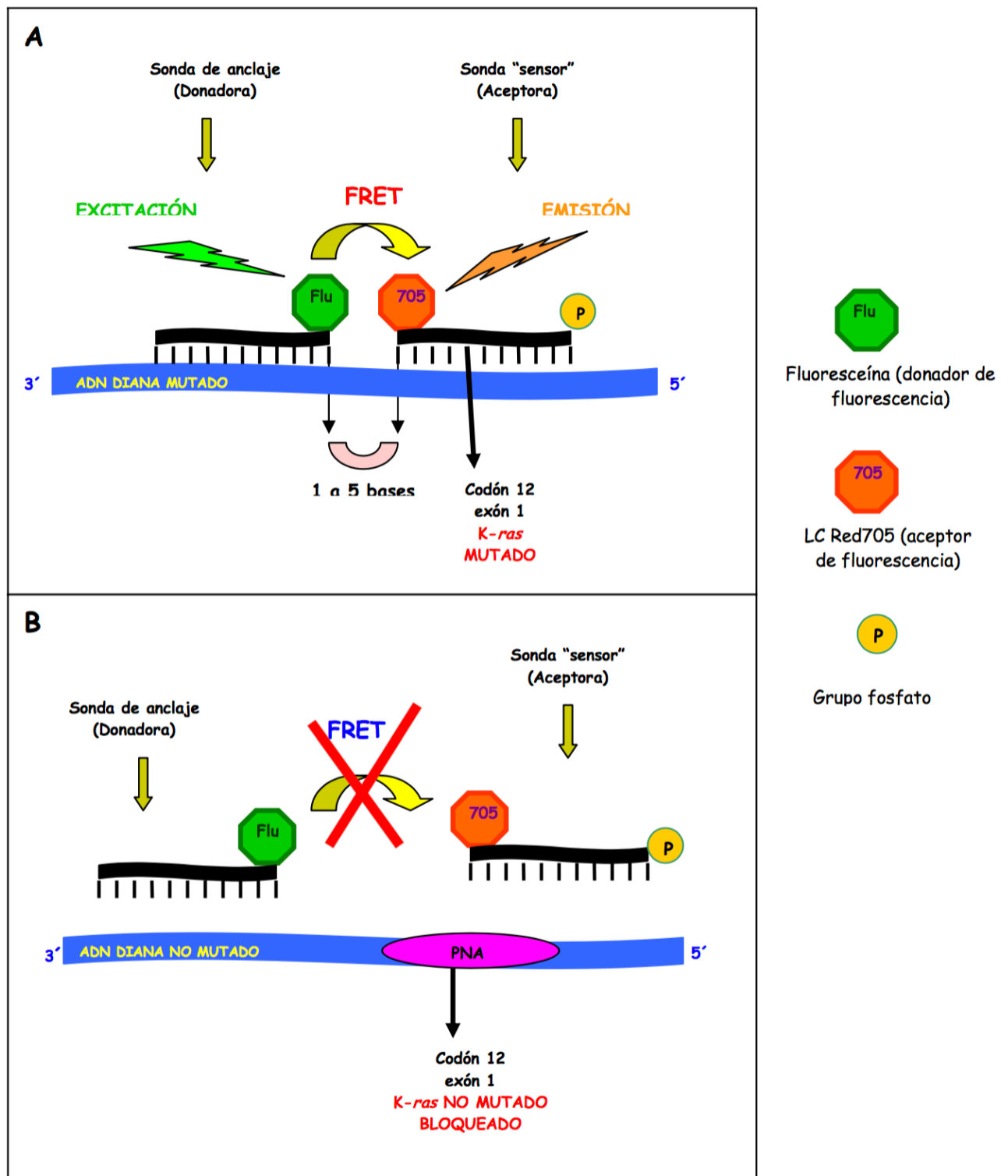


Figura 12. Sistema FRET-PNA para la detección de mutaciones puntuales en el codón 12 del exón 1 del gen KRAS humano. A: unión de las sondas FRET al ADN con mutación en KRAS; B: bloqueo de la secuencia no mutada de KRAS por la sonda PNA. Fuente: Domínguez Berzosa C. (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.

3.5.- MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ADN PLASMÁTICO

La cuantificación del ADN plasmático se realizó mediante tres técnicas distintas.

3.5.1.- Cuantificación mediante fluorimetría

Es un método de cuantificación que se realiza sin extracción previa del ADN. Se utilizó el kit “Quant-iT dsDNA Assay Kit, High Sensibility” (Invitrogen, Waltham, MA, USA) sobre las muestras de plasma, siguiendo las instrucciones del fabricante, y los resultados se determinaron cuantificando el marcador fluorescente mediante un fluorímetro (Spectramax Lab, Molecular Devices, Silicon Valley, California, USA). Para ello se utilizaron placas de 96 pocillos donde se ubicaron las muestras.

Se equilibraron todos los reactivos a temperatura ambiente, y se hizo la solución de trabajo, para lo cual se diluía el reactivo Quantit ds DNA HS (reactivo A) con dsDNA HS buffer (reactivo B) en una proporción de 1:200. Seguidamente, se ponía en cada pocillo 200 µl de esta solución, 10 µl de la solución estándar, y 10 µl de la muestra problema. Todas las muestras (estándares y plasmas) se realizaron por duplicado y en horizontal, como se muestra en la figura 13.

St1	st 1	St2	st 2	st 3	st 3	st 4	st 4	st 5	st 5	st 6	st 6
st 7	st 7	st 8	st 8								
MX 1	MX1	MX 2	MX 2	MX 3	MX 3	MX 4	MX 4	MX 5	MX 5	MX 6	MX 6
10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL
MX 7	MX 7	MX 8	MX 8	MX 9	MX 9	MX	MX	MX	MX	MX	MX
10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10	10	11	11	12	12
						10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL

Figura 13: protocolo para la cuantificación de las muestras por fluorimetría.

Durante todo el proceso se protegieron de la luz los reactivos y tampones con papel de aluminio, para evitar deterioro de la actividad de los fluoróforos.

Para la cuantificación del ADN mediante este procedimiento es preciso crear previamente una curva estándar que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, se usó como patrón y se guardó como plantilla. Posteriormente, realizadas las diluciones y puestas las muestras en los pocillos se procedió a medir la fluorescencia usando un lector de placas que cuantificó la emisión de fluorescencia en un rango determinado de longitud de onda (excitación 510/ máxima emisión 527 nm), comparándola con la curva estándar creada con anterioridad mediante el Software SoftMax Pro versión 5.2, según se muestran en la figura 14. De esta forma se obtuvieron las cuantificaciones de ADN plasmático en pg/μl.

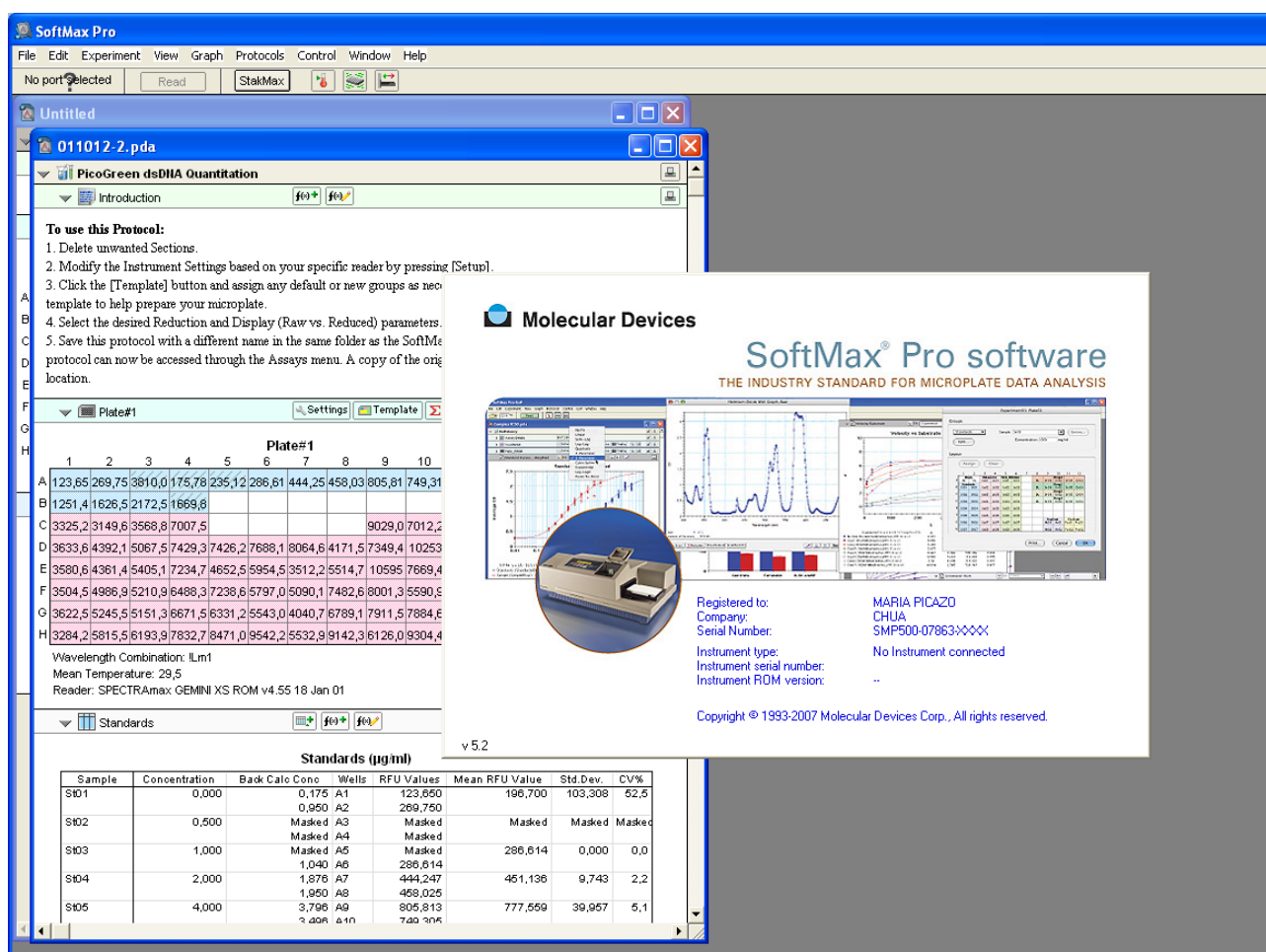


Figura 14: cuantificación de ADN por fluorimetría.

3.5.2.- Cuantificación mediante espectrofotometría de retención de muestra

Se utilizó un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop; ND-1000 Spectrophotometer, Wilmington, USA) como el que se muestra en la figura 15, que permite analizar 1 μ l de muestra con gran precisión, utilizando la tecnología de retención de muestra sobre una plataforma de medición. Así, tras la extracción del DNA utilizamos un volumen de 2 μ l en 3 determinaciones consecutivas, midiendo la absorbancia a 260-280 nm. Al inicio de cada sesión y cada 5 determinaciones se hacía un “blanco” con 2 μ l de agua ultrapura MilliQ (Purite Select BiOClub, Durvitz S.L. Paterna, Valencia) en el sistema para minimizar errores en las determinaciones. Todas las muestras fueron medidas por triplicado, para confirmar la exactitud de los resultados, y se obtuvieron las determinaciones de ADN plasmático en pg/ μ l.

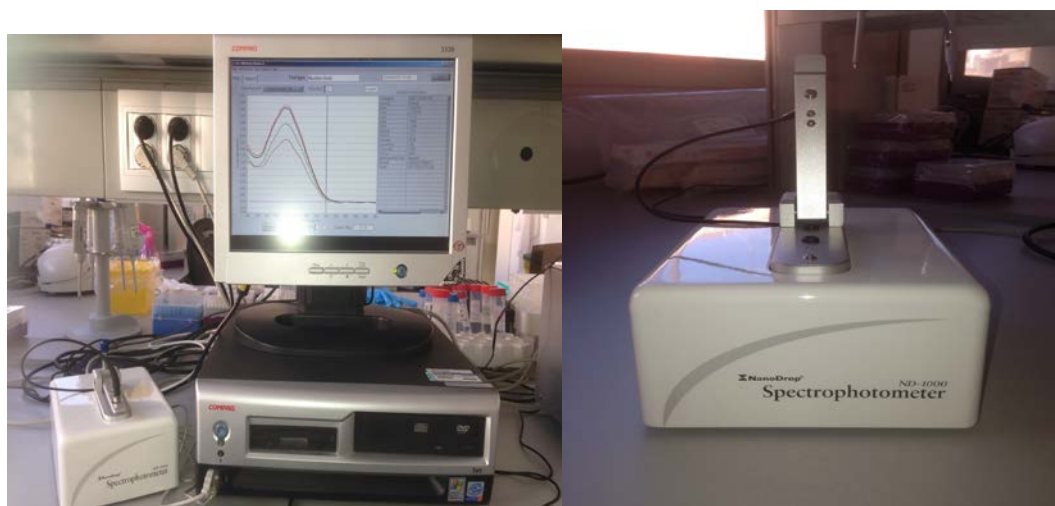


Figura 15. Espectrofotómetro Nanodrop: ND-1000.

3.5.3.- Detección y cuantificación de secuencias de *KRAS* mediante PCR en tiempo real del ADN plasmático total

Las muestras de plasmas pre y postoperatorias se analizaron mediante PCR en tiempo real con sondas FRET, con un protocolo similar al descrito para el análisis del ADN procedente de los tumores.

Primero, se amplificó la totalidad de las secuencias del gen *KRAS* de cada muestra (ADN mutado y no mutado) en una PCR sin sonda PNA, con el fin de comprobar la

presencia de ADN plasmático. Seguidamente, en las muestras de los pacientes cuyos tumores tenían *KRAS* mutado, se realizó una segunda PCR con PNA y la sonda específica para la mutación tumoral, poniendo 3 réplicas de cada muestra con un volumen de 7 µl de ADN.

En las PCR sin sonda PNA se incluyeron ADN procedentes de tumores con secuencias conocidas de *KRAS* y ADN procedente de plasmas de voluntarios sanos como controles positivos y agua como control negativo, y en las PCR con sonda PNA se incluyeron ADN procedentes de tumores con secuencias conocidas de *KRAS* como controles positivos y ADN procedente de plasmas de voluntarios sanos y agua como controles negativos.

El ADN obtenido por el método descrito en el punto 3.3.2 se analizó mediante una técnica de PCR-Q con sondas FRET para la cuantificación de secuencias de *KRAS* total (mutado y no mutado) y detección de ADN mutado utilizando el equipo ya mencionado denominado “LightCycler”.

Para el análisis de las muestras de ADN plasmático se utilizó un protocolo similar al descrito para la detección de ADN tumoral plasmático, pero fue preciso generar previamente las consiguientes curvas estándar externas para cuantificar, a las que se ajustaron la curvas obtenidas de las muestras de nuestro estudio.

Para obtener la curva estándar, se realizó la amplificación de réplicas de ADN de un tumor con la mutación Gly12Asp mediante PCR en tiempo real. Una vez finalizada la PCR, se recuperaron los productos amplificados y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE) con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las bandas de ADN fueron visualizadas mediante un sistema de fotodocumentación modelo IP-010-SD de Vilber Lourmat (Torcy, Marne La Vallée, France), se cortaron con un bisturí y se purificó el ADN con el “kit” comercial “DNA Gel Extraction Kit” (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se valoró la concentración total del ADN mediante “NanoDrop” y se procedió a la obtención de los patrones o “estándares” para generar la curva. Para ello, se realizaron diez diluciones con agua MilliQ (Purite Select BiOClub, Durviz S.L. Paterna, Valencia), y se valoró la concentración de ADN de cada dilución con “Nanodrop”. Se realizó una PCR cuantitativa de las diluciones y así se

obtuvo la curva estándar externa. Para ser aceptada como válida, la curva tuvo que cumplir tres requisitos:

- La pendiente (“slope”) debía ser menor de -2,9 (da idea de la eficiencia de la reacción).
- El error debía ser menor de 0,1 (informa sobre las variaciones entre muestras - errores experimentales de “pipeteo”).
- El coeficiente de regresión (R) debía ser igual a 1 (da información sobre errores sistemáticos, por ejemplo, el error acumulado al hacer las diluciones seriadas).

La gráfica fue creada con el logaritmo de la concentración de ADN frente al número de ciclos y las unidades en las que se realizaron las cuantificaciones fueron pg/reacción.

Una vez obtenida la curva estándar, se procedió a realizar las PCR de los plasmas. En cada sesión se pusieron 3 réplicas por muestra y se incluyeron 4 estándares. Siempre que se pudo, la cuantificación se realizó con los estándares introducidos en cada sesión. Cuando la curva generada por los estándares no cumplió los requisitos mencionados anteriormente, se recurrió a la curva estándar externa. Se estableció como referencia el que la desviación estándar de los ciclos umbral de las tres réplicas no superase los 0,5 ciclos. Si en algún caso se superaba este límite, se repitió la PCR.

Los estándares se mantuvieron a 4°C mientras se realizaban las distintas PCR. En el momento en el que se observó variabilidad en los ciclos umbral de los estándares, se hicieron nuevas diluciones a partir de una nueva alícuota de la solución original.

Tras la realización de la PCR, el sistema cuantificaba sobre la base de la curva estándar, dando valores medios de las 3 réplicas de cada muestra. A partir de esos resultados pudimos calcular la cantidad total de ADN que había por muestra de plasma, mediante los siguientes cálculos:

Cantidad de ADN por ml de plasma (pg/ml): **$x \text{ pg} / 2 \text{ microl} \times 100 \text{ } \mu\text{l} \times 1 \text{ ml}$**

2 μl : cantidad de ADN de partida para la PCR.

100 μl : volumen de elución del ADN.

1 ml: volumen de plasma de partida.

Los valores obtenidos por el aparato reflejaban la cantidad de ADN (en pg) que había en los 2 μl de volumen de muestra de partida. En esta determinación se amplificaron la totalidad de la secuencias del gen *KRAS* en cada muestra, es decir, el ADN mutado y no mutado. Cada reacción se realizó por triplicado utilizando 2 μl de muestra; y para ello se incluyeron en las PCR ADN procedente de tumores con secuencias conocidas de *KRAS* como control positivo, y ADN de voluntarios sanos y agua como controles negativos.

Para las determinaciones de ADN plasmático mutado se amplificaron únicamente la secuencias mutadas del gen *KRAS* tras conocer previamente la mutación específica del tumor.

Dada las bajas concentraciones de ADN plasmático mutado, en las PCR-Q se consideraron el número de réplicas positivas obtenidas. Cada PCR se realizó dos veces y en cada reacción se utilizaron muestras de ADN plasmático por triplicado empleando 7 μl de volumen de muestra de ADN en cada réplica. De esta forma se obtuvieron 6 posibilidades de determinación de ADN mutado para cada una de las muestras plasmáticas, 3 por cada una de las dos PCR realizadas sobre cada muestra. En cada PCR se incluyeron ADN procedente de plasmas con secuencias mutadas conocidas de *KRAS* como control positivo; y plasma de voluntarios sanos y agua como controles negativos.

3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.6.1.- Análisis descriptivo

Para describir la distribución de cada variable como índices estadísticos, se calcularon porcentajes en el caso de variables cualitativas, y medidas de tendencia central y dispersión para sintetizar la distribución de las variables cuantitativas, así como sus intervalos de confianza. Como índices complementarios se consideró, en estas últimas, la asimetría de la distribución y el grado de apuntamiento respecto de la ley normal, con objeto de comprobar la idoneidad en la aplicación de posteriores test estadísticos que exigen la normalidad de la distribución de las variables.

Los datos fueron sintetizados mediante la oportuna tabulación y representados gráficamente mediante diagramas de dispersión con sus correspondientes rectas de ajuste, en el caso de variables cuantitativas.

3.6.2.- Análisis bivalente

Para estudiar la asociación o relación entre dos variables cualitativas se utilizó una prueba de independencia para comparar proporciones observadas en grupos independientes (ji-cuadrado), verificándose las condiciones de aplicación (efectivos esperados no inferiores a 5, o no inferiores a 3 empleando la corrección de Yates). Cuando no se cumplieron las condiciones de aplicación se empleó la prueba exacta de Fisher. En la comparación de proporciones observadas en los mismos sujetos, mediante medidas repetidas, se empleó la prueba de simetría de McNemar.

En el caso de una variable binaria y otra con más de dos categorías ordenadas, se aplicó la prueba de tendencia lineal de Mantel-Haenscel, con objeto de establecer una asociación lineal significativa.

Para estudiar la relación entre una variable binaria y una cuantitativa, se utilizó la prueba "t" de comparación de medias en grupos independientes basada en la ley de Student-Fisher. La hipótesis de igualdad de varianzas se verificó con la prueba F basada

en la ley de Snedecor, suponiendo en ambas pruebas que la variable cuantitativa seguía en la población una ley normal por tratarse de muestras consideradas grandes desde el punto de vista estadístico. También se emplearon pruebas de comparación de medias para medidas repetidas cuando se efectuaron comparaciones en los mismos sujetos. Por último, se utilizaron pruebas no paramétricas ("U" de Mann-Whitney en grupos independientes y "T" de Wilcoxon en medidas repetidas) cuando la distribución de alguna de las variables presentaba marcadas anomalías (asimetría, etc) o al comparar grupos pequeños, cuando se vulneraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

En la comparación de medias en más de dos grupos independientes se utilizó el Análisis de Varianza y la prueba "H" de Kruskal-Wallis, empleando esta última cuando no se verificaban las condiciones de aplicación de la primera (homogeneidad de varianza) o en el caso de variables con categorías ordenadas. Paralelamente, en caso de medidas repetidas, se empleó el correspondiente análisis de varianza o la prueba de Friedman.

3.6.3.- Análisis multivariante

Mediante el procedimiento "Logistic Regression" del sistema SPSS, se construyó un modelo de regresión logística con la finalidad de analizar la relación entre las variables independientes estudiadas y la existencia de progresión de la enfermedad (variable dependiente), introduciendo variables de ajuste para controlar la confusión y comprobando la existencia de variables modificadoras de efecto e interacciones. El objeto de dicho análisis fue estimar los coeficientes de regresión parcial que expresan el peso de las distintas variables independientes en la explicación de la variabilidad de la existencia de progresión tumoral. La variable dependiente considerada es la existencia de progresión (0: no progresión ;1: progresión), y el resto de variables fueron las siguientes:

- Edad en años cumplidos.
- Sexo: (0: mujer; 1: hombre).
- Existencia de metástasis al diagnóstico: (0: No ;1: Sí)

- Existencia de afectación ganglionar: (0: No ;1: Sí)
- Estadío T: (0: T1-T2 ;1: T3-T4)
- Localización del tumor: (0: resto de localizaciones; 1: sigma)
- Mutación en el gen *KRAS*: (0: No; 1: Sí)
- Tratamiento quimioterápico: (0: No; 1: Sí)
- Además se introdujeron, en modelos separados, los valores totales de ADN plasmático total prequirúrgico (y postquirúrgico, según el modelo) medidos por PCR, por espectrofotometría y por fluorimetría

Las variables se introdujeron secuencialmente en el modelo como variables de control a través del método de inclusión por pasos. Se incluyeron las variables con valores $p \leq 0,05$ en la prueba de razón de verosimilitud y fueron excluidas cuando $p \geq 0,10$.

Los criterios de convergencia utilizados comportaban detener el ciclo cuando el cambio en todos los parámetros estimados era inferior a 0,0001 o si la proporción de cambio de logaritmo de la función de verosimilitud era inferior a 0,0001.

El ajuste del modelo se valoró mediante la comparación de valores predichos y observados (especificidad, sensibilidad y clasificaciones correctas).

La exponencial de cada parámetro (OR) representó el factor por el cual se multiplicaba la *odds* de la respuesta estudiada al variar el valor de cada una de las variables consideradas.

3.6.4.- Análisis de la supervivencia

Se realizaron análisis de la supervivencia para describir la evolución de la progresión de la enfermedad y mortalidad de los sujetos a lo largo de diferentes intervalos de tiempo, utilizándose como técnica el método de estimación actuarial o método de la tabla de vida y el método de Kaplan-Meier, a través del procedimiento Survival del Sistema SPSS, el cual permite agrupar los tiempos de supervivencia en intervalos

regulares con lo que se sintetiza la información obtenida. La variable tiempo de progresión fue obtenida a partir de la fecha de intervención y la de diagnóstico, de datos de progresión clínica o radiológica de su enfermedad. La variable tiempo de supervivencia fue obtenida a partir de la fecha de intervención y de la fecha de la última revisión o fecha de fallecimiento. Se utilizó como unidad de medida temporal el mes, definiendo su equivalencia estadística en días ($1 \text{ mes} = 30,4375 \text{ días}$). En cada caso se calculó la mediana del tiempo de supervivencia, que es el índice más adecuado para describir la tendencia central de la distribución de supervivencia.

También se obtuvo la función de densidad de probabilidad y se calculó la función de riesgo junto a la estimación de los correspondientes errores estándar. La primera definida como la probabilidad por unidad de tiempo que tiene un sujeto de morir, y la segunda como la tasa media de muertes en cada intervalo, proporcionando un valor que indica el riesgo de muerte por paciente y mes.

Posteriormente, se procedió al cálculo de las curvas de supervivencia, representando en función del tiempo las probabilidades acumuladas de supervivencia estimadas (probabilidad de que un paciente intervenido de CCR permanezca vivo en cada periodo considerado).

También se realizaron comparaciones de curvas de supervivencia mediante la prueba de Mantel-Haenszel (logrank) que compara el número de muertes en diferentes grupos con el número de muertes esperadas en el caso de que los mismos fueran similares (ley de Ji-cuadrado).

Finalmente se construyeron modelos de riesgo proporcionales de Cox (procedimiento Cox-Reg del Sistema SPSS) para analizar los efectos de las variables independientes consideradas sobre la variable dependiente tiempo de supervivencia y tiempo de progresión en los sujetos. Este modelo permitió establecer factores pronósticos significativamente relacionados con el tiempo de supervivencia (riesgo de muerte) y tiempo de progresión (riesgo de progresión). Se utilizó el método de inclusión por pasos, analizando la significación global del modelo mediante la prueba de Rao y la significación de cada variable con la prueba de la razón de verosimilitud. Las variables independientes fueron introducidas de forma dicotómica de la siguiente manera:

- Edad en años cumplidos.
- Sexo: (0: mujer; 1: hombre).
- Existencia de metástasis al diagnóstico: (0: No ;1: Sí).
- Existencia de afectación ganglionar: (0: No ;1: Sí).
- Estadio T: (0: T1-T2 ;1: T3-T4).
- Localización del tumor: (0: resto de localizaciones; 1: sigma).
- Mutación en el gen *KRAS*: (0: No; 1: Sí).
- Tratamiento quimioterápico: (0: No; 1: Sí) .
- Además se introdujeron, en modelos separados, los valores totales de ADN plasmático total prequirúrgico (y postquirúrgico, según el modelo) medidos por PCR, por espectrofotometría y por fluorimetría.
- Supervivencia total: (en meses).
- Supervivencia libre de enfermedad o progresión: (en meses).

4.- RESULTADOS

4.1.- ANÁLISIS DESCRIPTIVO

4.1.1.- Características demográficas y epidemiológicas de la población de estudio

En el presente estudio participaron un total de 71 pacientes diagnosticados de CCR. La edad media fue de $73,1 \pm 10,8$ meses (IC 95%: 70,6-75,7), con una mediana de 75,4 y un rango de 44 años respectivamente. Además, la edad siguió una distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 1,183; $p = n.s.$), como puede apreciarse en la figura 16. En cuanto al sexo el más frecuente fue el género masculino (66,2%), sin que existieran diferencias significativas en cuanto a la edad entre hombre y mujeres.

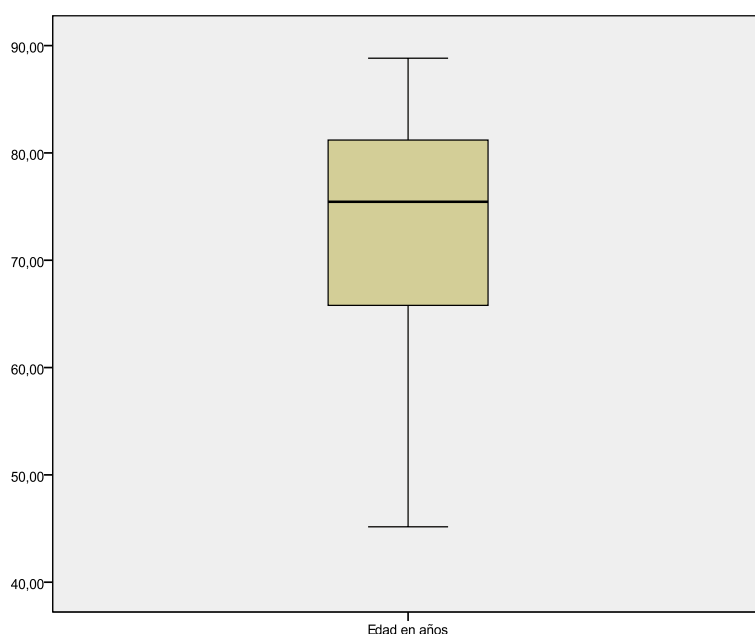


Figura 16: distribución de la edad.

Se evaluaron también los valores séricos de los marcadores tumorales empleados habitualmente en la práctica clínica, CEA y Ca 19.9 en el perioperatorio, cuyos valores se muestran en la tabla 7.

	MEDIA	IC 95%	MEDIANA	DESV. TÍPICA	RANGO
--	-------	--------	---------	--------------	-------

CEA					
+PREOPERATORIO	15,8	9,1-22,5	4,2	25,3	130
+POSTOPERATORIO	8,3	2,5-14,2	2,5	22,1	149
Ca 19,9					
+PREOPERATORIO	37,6	19,5-55,7	16	58,8	317
+POSTOPERATORIO	34,8	14,9-54,7	14	64,8	365

Tabla 7: niveles séricos de los marcadores tumorales.

Los niveles de CEA antes y después de la cirugía no siguieron distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 2,227 para CEA precirugía $p < 0,0001$ y 3,085 para CEA postcirugía $p < 0,0001$). Los niveles de CA 19.9 antes y después de la cirugía no siguieron distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 2,135 para CA 19.9 precirugía $p < 0,0001$ y 1,127 para CA 19.9 postcirugía $p < 0,0001$).

No obstante, puede observarse un descenso en los valores postquirúrgicos de ambos marcadores, como queda reflejado en la figura 17.

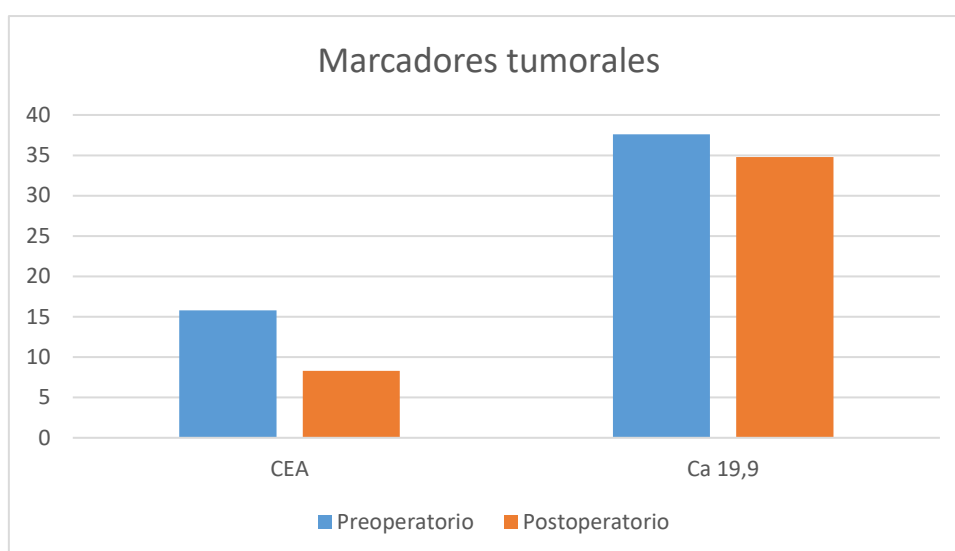


Figura 17: evolución de los marcadores séricos.

Por otra parte, las principales características de la estadificación tumoral de los pacientes quedan reflejadas en la tabla 8. En ella se puede observar que, en la clasificación por estadios, el más frecuente fue el III, seguido del II, lo que se corresponde con la mayor frecuencia del estadio C en la clasificación de Dukes. Cabe destacar que casi el 20% de los pacientes que se intervinieron se encontraban en estadio IV de la enfermedad cancerosa.

	N	Frecuencia (%)
Estadio pT		
+pT0 (carcinoma in situ)	1	1,4
+ pT1	5	7
+pT2	5	7
+pT3	42	59,2
+pT4	18	25,4
Estadio pN		
+N0	32	45,1
+N1	17	23,9
+N2	22	31
Estadio M		
+M0	57	80,3
+M1	14	19,7
Estadio TNM		
+ TNM 0	1	1,4
+ TNM I	8	11,3
+ TNM II	20	28,2
+ TNM III	28	39,4
+ TNM IV	14	19,7
Estadio DUKES		
+ A	8	11,3
+ B	20	28,2
+ C	28	39,4
+ D	14	19,7
+carcinoma in situ	1	1,4
Total	71	100

Tabla 8: principales características en la estadificación tumoral.

En cuanto a la localización del tumor primario, la ubicación más frecuente fue en el sigma. El diagnóstico histopatológico de la pieza tumoral fue de adenocarcinoma en todos los casos, con mayor incidencia del moderadamente diferenciado. Cabe señalar un caso en el que se objetivó un carcinoma *in situ* sobre un pólipo vellosos en el análisis definitivo de la pieza quirúrgica. Además, el 6% de los pacientes presentaron carcinomatosis al diagnóstico. Otros datos relevantes del estudio clínico y anatomopatológico quedan reflejados en en la tabla 9.

	N	Frecuencia (%)
LOCALIZACIÓN		
+ Ascendente	27	38
+Transverso	6	8
+Descendente	8	11
+ Sigma	29	41
ANATOMÍA PATOLÓGICA		
+ Bien diferenciado	9	13
+Moderadamente diferenciado	42	61
+ Mal diferenciado	9	13
+ Mucinoso	10	14
+ Carcinoma in situ	1	1
INVASIÓN LINFÁTICA		
+Presente	49	69
+Ausente	22	31
INVASIÓN PERINEURAL		
+Presente	27	38
+Ausente	44	62
CARCINOMATOSIS		
+Presente	4	6
+Ausente	67	94

Tabla 9: resumen de los datos clínicos y anatomopatológicos.

Además, cabe destacar que en el reclutamiento de los pacientes finalmente incluimos 8 pacientes (11%) con antecedentes de otras neoplasias previas, algunos de los cuales presentaban antecedente de varias neoplasias, pero todos ellos sin enfermedad residual en el momento de la inclusión en el estudio tras más de 5 años de seguimiento por dicha enfermedad, como se muestra en la tabla 10.

	N	Frecuencia (%)
Neoplasias previas		
+SÍ	8	11
+NO	63	89
Tipo de neoplasia previa		
+ADC de intestine delgado	1	1
+Ca endometrio, Ca renal, Ca gástrico	1	1
+Ca epidermoide de pulmón y de mano	1	1
+Ca papilar de tiroides	1	1
+Ca doble de mama	1	1
+Linfoma no Hodgkin fenotipo B	1	1
+Mieloma no secretor	1	1
+Ca de próstata	1	1
Total	8	11

Tabla 10: resumen de pacientes con neoplasias previas. ADC: adenocarcinoma; CA: carcinoma.

Tras la intervención quirúrgica, el 27% de los pacientes presentaron algún tipo de complicación postoperatoria, de las cuales los abscesos abdominales y las dehiscencias de la anastomosis quirúrgica fueron los más frecuentes. Dentro del epígrafe “otros” hemos incluido complicaciones como un estatus epiléptico, una pancreatitis aguda postoperatoria y una descompensación hidrópica. Además hay que destacar que algunos pacientes sumaron más de una complicación y tuvimos un exitus intrahospitalario en un paciente con varios episodios de dehiscencia de suturas, abscesos y sepsis abdominal. Las principales complicaciones postquirúrgicas quedan reflejadas en la tabla 11.

	N	Frecuencia (%)
Complicaciones postquirúrgicas		
+SÍ	19	27
+NO	52	73
Tipos de complicaciones		
+Abscesos abdominales	6	8,5
+Dehiscencias de anastomosis	5	7
+Derrame pleural/neumonía	4	5,6
+Infección de herida quirúrgica	3	4,2
+Hemorragias	2	2,8
+Otros	3	4,2
+Exitus intrahospitalario	1	1,4

Tabla 11: incidencia y resumen de las principales complicaciones postoperatorias.

El 41% de los pacientes de nuestro estudio recibió quimioterapia adyuvante, siguiendo los esquemas que se muestran en la tabla 12. Como puede observarse, el más frecuente fue la combinación de Fluorouracilo + Oxaliplatino (FOLFOX), que se siguió en el 18% de los pacientes. El número medio de ciclos administrados fue de 9,03 (SD: 6,31). Mínimo de ciclos 4 y máximo de 36. Cabe destacar la baja frecuencia en la que se emplearon los fármacos basados en anticuerpos monoclonales anti-EGFR, constituidos por el Bevacizumab y Cetuximab, que únicamente se administraron en 3 pacientes (4%).

Se produjo recidiva en el 6% de los pacientes y en el 28% hubo progresión de la enfermedad tumoral, tomando como punto de partida la situación oncológica al diagnóstico.

La mortalidad registrada fue de 11 pacientes (16%), de las cuales 7 (10%) fueron atribuibles directamente a su enfermedad tumoral, y 4 (6%) fueron por otras causas ajenas al CCR.

	N	Frecuencia (%)
Quimioterapia adyuvante		
+SÍ	29	41
+NO	42	59
Esquemas de quimioterapia		
+XELOX	13	18
+XELODA	6	9
+FOLFOX	3	4
+FOLFOX/FOLFIRI	1	1
+FOLFOX/XELOX	1	1
+XELODA/CAPECITABINA	1	1
+XELOX/FOLFOX	1	1
+XELOX/FOLFIRI-	1	1
BEVACIZUMAB	1	1
+XELOX/FOLFIRI/FOLFOX-	1	1
CETUXIMAB	1	1
Total	29	40,8

Tabla. 12: resumen del tratamiento quimioterápico adyuvante.

El seguimiento medio de los pacientes fue de $27,3 \pm 14,4$ meses (IC95%: 23,8-30,7), con una mediana de 28,3 y un rango de 50,9 meses respectivamente, como se muestra en la figura 18.

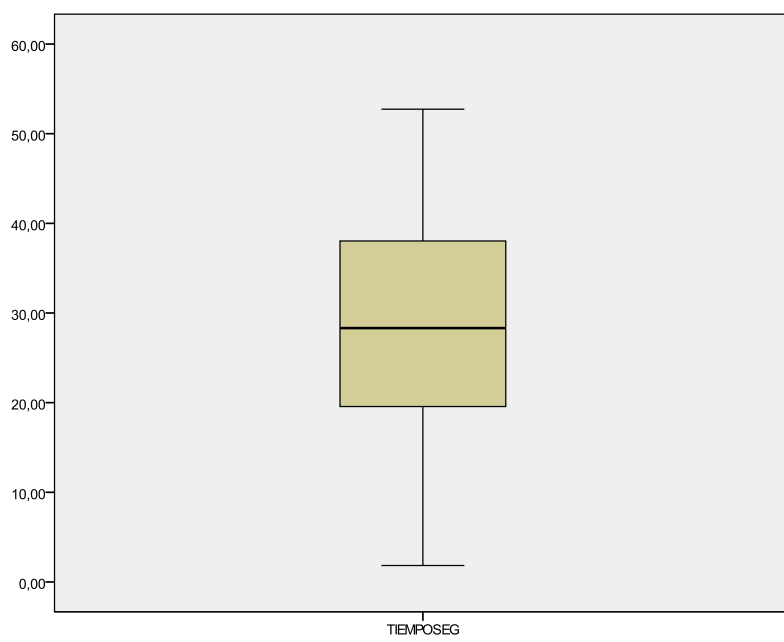


Figura 18: tiempo de seguimiento medio expresado en meses.

El tiempo de seguimiento sigue distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 1,077; $p = \text{n.s.}$).

Finalmente, el tiempo de conservación de las muestras presentó una media de 9 ± 7 meses (IC 95%: 8,1-11,4), con una mediana de 7,9 y un rango de 23 meses, como se muestra en la figura 19.

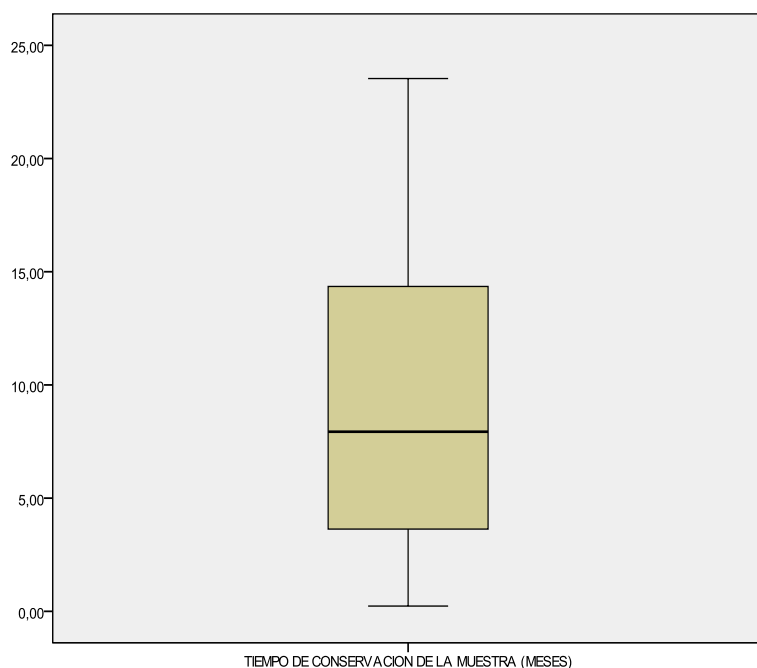


Figura 19: tiempo de conservación de la muestra expresado en meses.

El tiempo de conservación de la muestra siguió una distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 0,95; $p = \text{n.s.}$).

4.1.2- ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Se elaboraron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, lo que permitió calcular las probabilidades acumuladas de los eventos de progresión y de supervivencia individual para cada una de las variables durante el periodo de seguimiento de nuestra población de estudio.

4.1.2.1.- Tiempo de recidiva o progresión (supervivencia libre de enfermedad: *Desase Free Survival: DFS*)

Se realizó el análisis del tiempo de recidiva o progresión para establecer el *DFS*, y se obtuvo una media de 24 ± 16 meses (IC 95%: 20,2-27,8), con una mediana de 27 y un mínimo y máximo de 1 y 56 meses respectivamente. El tiempo de supervivencia libre de enfermedad sigue distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 1,157; p n.s)(Figura 20).

Con los datos anteriores se evaluó el *DFS* en meses, teniendo en cuenta para esta estimación que hablamos de progresión, no de mortalidad (Figura 21). Se obtuvo una supervivencia media de 41 meses (IC95%: 35,9-46,6). A partir de la curva de supervivencia se elaboró la tabla de vida 1, que permite observar el riesgo de progresión anual. En ella se observa cómo la **probabilidad de progresión de la enfermedad fue más acusada los dos primeros años** de la enfermedad.

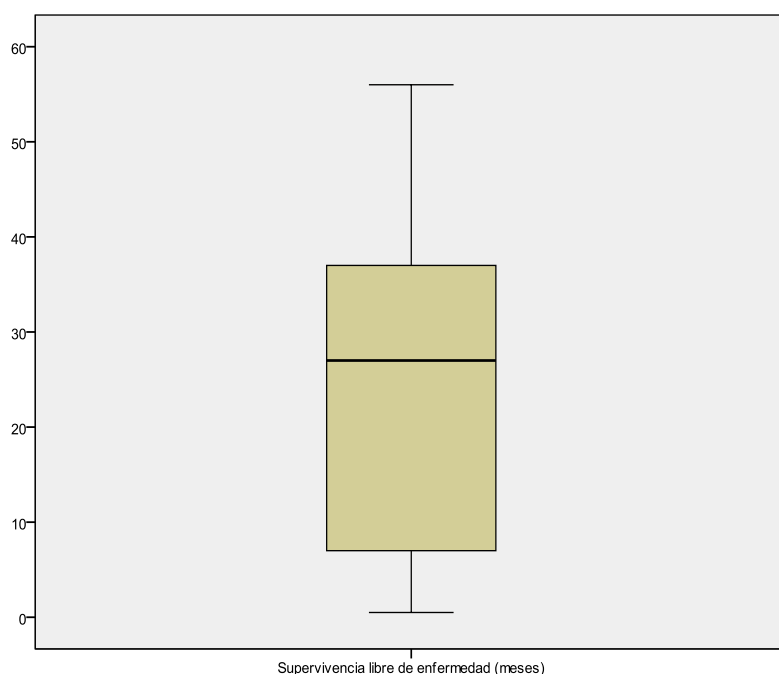


Figura 20: tiempo de supervivencia libre de enfermedad expresado en meses.

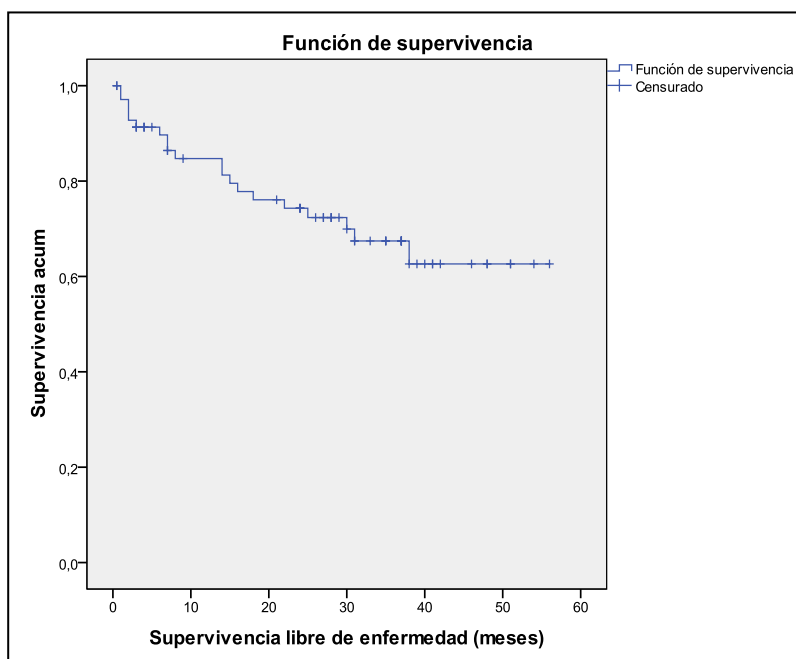


Figura 21: curva de supervivencia libre de enfermedad expresada en meses.

	Probabilidad acumulada de no progresar en el periodo	Error típico de la probabilidad acumulada
A 12 MESES	91,3%	0,34
A 24 MESES	77,8%	0,53
A 36 MESES	72,3%	0,58
A 48 MESES	69,9%	0,61
A 60 MESES	62,6%	0,75

Tabla de vida 1.

4.1.2.2.- Tiempo de supervivencia total (Overall survival: OS)

Se realizó el análisis del OS incluyendo todas las variables en el modelo estadístico, y se obtuvo que los pacientes presentaron una media de supervivencia de $27,6 \pm 14,8$ meses (IC 95%: 24,1-31,1), con una mediana de 29 y un rango de 56 respectivamente. El tiempo de supervivencia total sigue distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov =0,906; p= n.s) (Figura 22).

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en el apartado anterior se elaboraron las curvas de OS (Figura 23) y se obtuvo una media de supervivencia de 48 meses (IC95%: 44,3-52,5). Sobre estos datos se realizó la tabla de vida 2 para calcular las

probabilidades acumuladas de supervivencia en los primeros 5 años, donde puede observarse un **descenso más acusado de la supervivencia a partir del tercer año.**

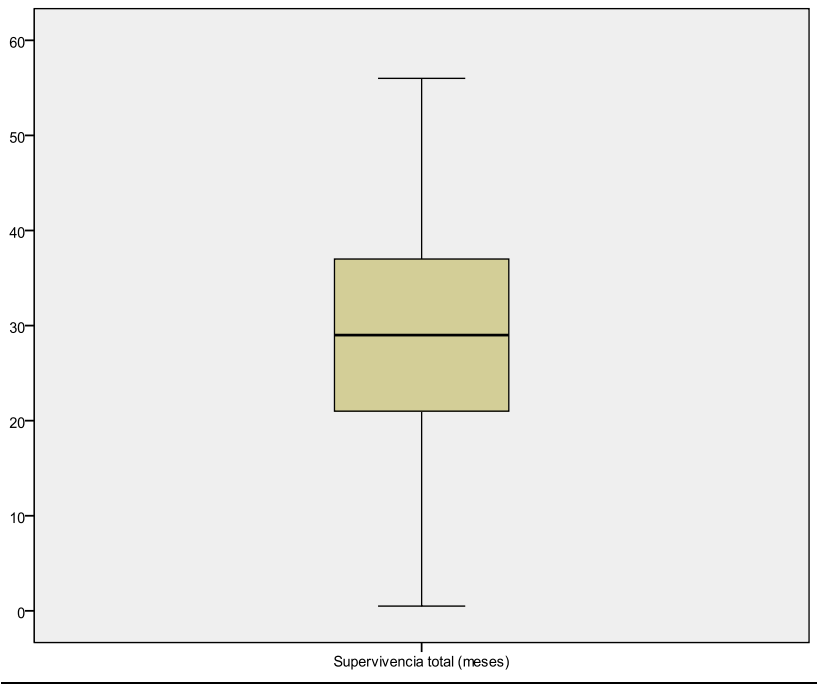


Figura 22: supervivencia total expresada en meses.

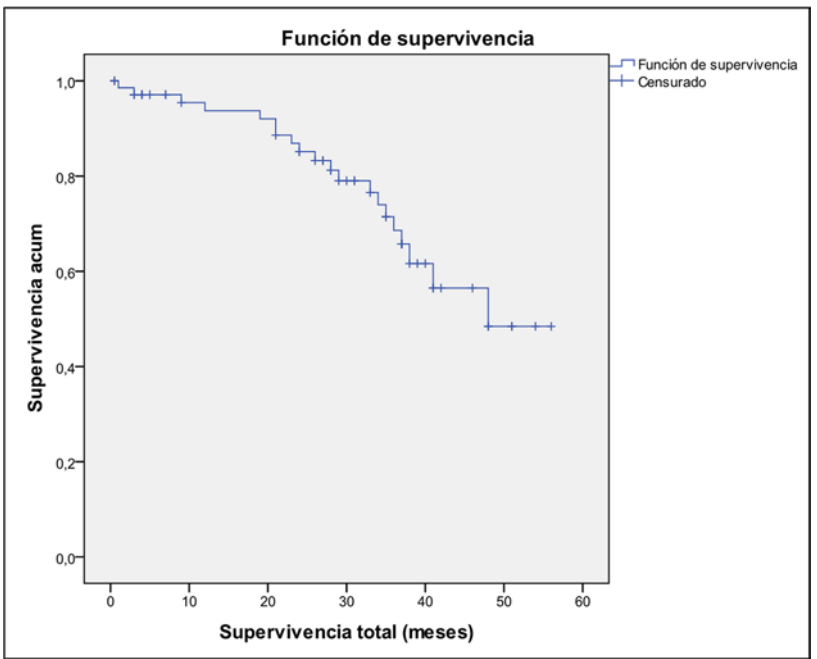


Figura 23: curva de supervivencia total expresada en meses.

	Probabilidad acumulada de supervivencia en el periodo	Error típico de la probabilidad acumulada
A 12 MESES	94%	0,3
A 24 MESES	92%	0,3
A 36 MESES	83%	0,5
A 48 MESES	73%	0,8
A 60 MESES	73%	0,8

Tabla de vida 2.

A continuación se analizó separadamente el **tiempo de supervivencia total cáncer específica** para determinar el impacto intrínseco del CCR en la OS, para lo cual se incluyeron en el modelo estadístico únicamente los pacientes fallecidos por CCR. Los datos siguieron una distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov 0,528; $p = \text{n.s.}$) y presentaron una media de supervivencia de $19,9 \pm 12,7$ meses (IC 95%: 8,1-31,6), con una mediana de 24 y un rango de 35 meses (Figura 24).

Con estos datos se elaboraron las curvas de supervivencia (Figura 25), y se obtuvo una media de supervivencia de 51 meses (IC95%: 47,6-54,5). Con los datos obtenidos se realizó la tabla de vida 3, donde puede observarse nuevamente un **descenso más acusado de supervivencia a partir del tercer año** de la enfermedad.

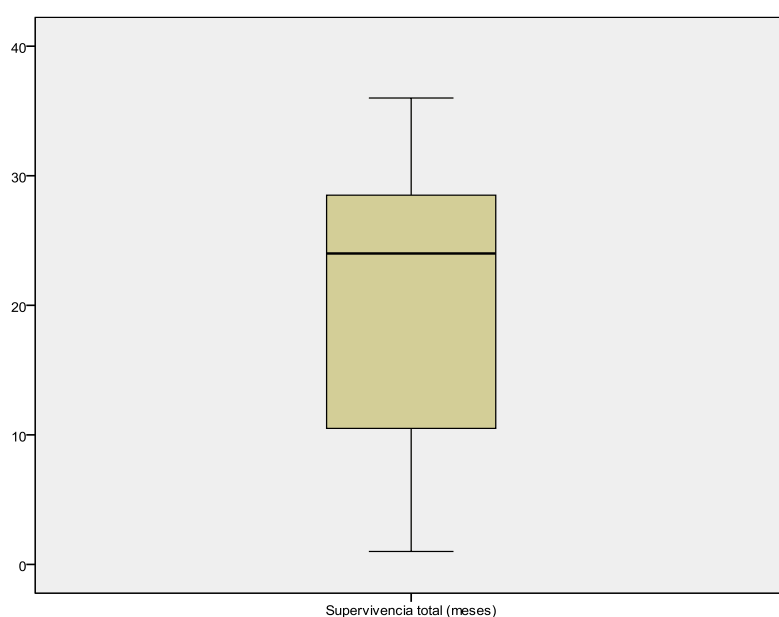


Figura 24: supervivencia total expresada en meses.

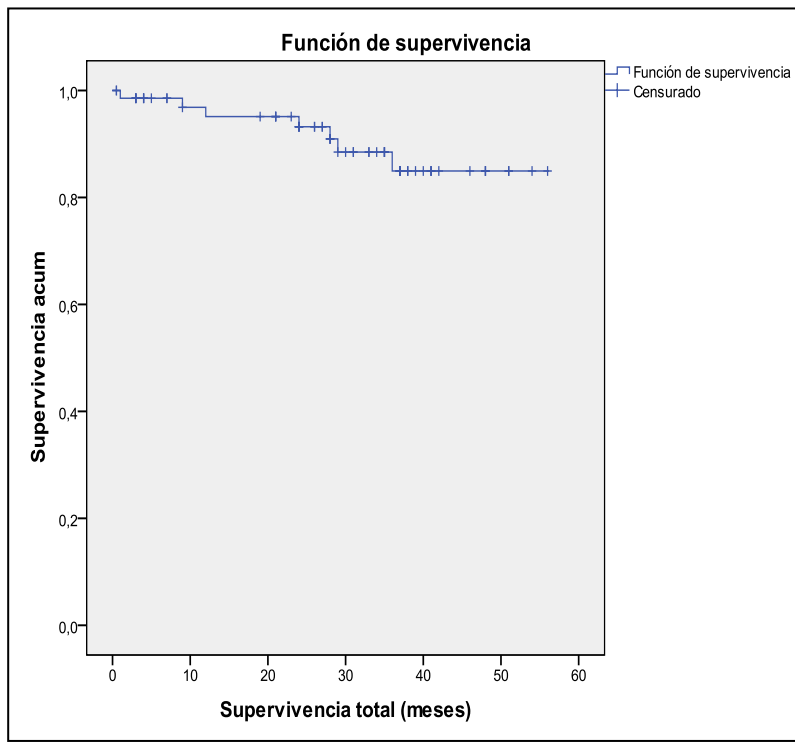


Figura 25: curva de supervivencia total cancer específica expresada en meses.

	Probabilidad acumulada de supervivencia en el periodo	Error típico de la probabilidad acumulada
A 12 MESES	97%	0,2
A 24 MESES	95%	0,3
A 36 MESES	88%	0,5
A 48 MESES	82%	0,7
A 60 MESES	82%	0,7

Tabla de vida 3.

Para una mejor discriminación del impacto de la enfermedad cancerosa se realizó también un análisis por separado del **tiempo de supervivencia** en casos de mortalidad por **causa no tumoral**, excluyendo del modelo estadístico todos los sujetos fallecidos por causa del propio CCR. Así, el tiempo de supervivencia no tumoral siguió una

distribución normal (Z de Kolmogorov-Smirnov =0,604) p = n.s) y presentó una media de $16,5 \pm 18,8$ meses (IC95%: -13,5-46,5), con una mediana de 14,2 y un rango de 37 meses (Figura 26).

Finalmente, se elaboraron las curvas de supervivencia de causa no tumoral (Figura 27) y se obtuvo la estimación de una media de 53 meses (IC95%: 50,2-55,8). Se realizó la tabla de vida 4, donde en este caso no se observa claramente un patrón de descenso significativo de probabilidad de supervivencia a lo largo del periodo de seguimiento.



Figura 26: supervivencia total expresada en meses.

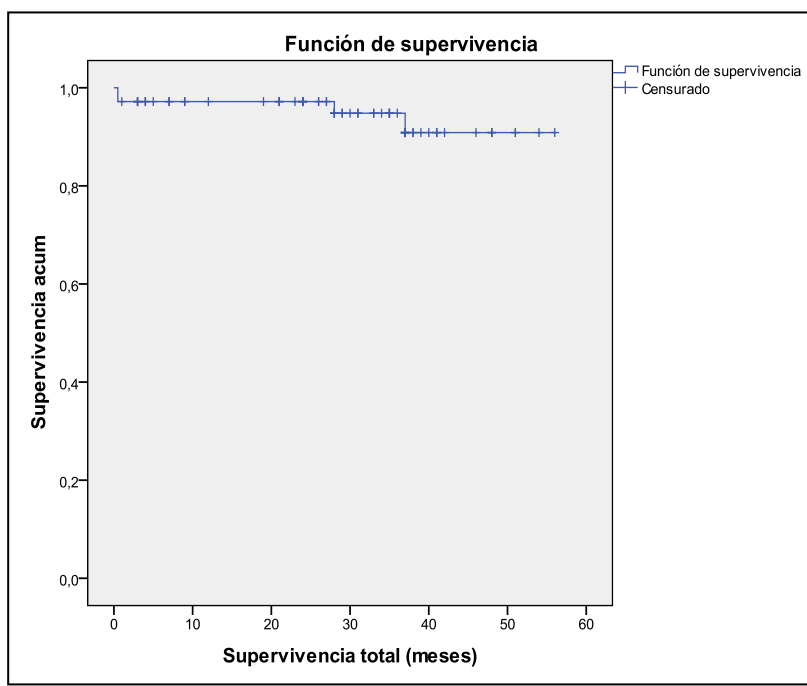


Figura 27: curva de supervivencia de causa no tumoral expresada en meses.

	Probabilidad acumulada de supervivencia en el periodo	Error típico de la probabilidad acumulada
A 12 MESES	97%	0,2
A 24 MESES	97%	0,2
A 36 MESES	94%	0,3
A 48 MESES	89%	0,6
A 60 MESES	89%	0,6

Tabla de vida 4.

4.2. VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL EN EL PREOPERATORIO COMPARANDO LAS TRES TÉCNICAS EMPLEADAS

4.2.1.- Relación de los niveles de ADN plasmático total con las variables clínicopatológicas.

Se realizó un primer estudio estadístico para evaluar el valor clínico de la cuantificación del ADN plasmático total mediante las tres técnicas descritas, en la

estadificación tumoral y su relación con las principales variables clínicopatológicas que analizamos en nuestro estudio (ver anexo 1). En la tabla se resumen los resultados obtenidos dicha comparación estadística (Tabla 13).

Los pacientes que presentaron *KRAS* mutado en el preoperatorio por espectrofotometría tenían valores más elevados de ADN total ($p= 0,035$). Por lo demás, no se halló ninguna correlación entre los niveles plasmáticos de ADN total obtenidos mediante los tres métodos de cuantificación y las variables clínicopatológicas estudiadas.

VARIABLES		PCR	Espectrofotometría	Fluorimetría
<i>KRAS</i>	No mutado Mutado	P N.S	P=0,035	P N.S
Localización	Resto colon Sigma	P N.S	P N.S	P N.S
Neoplasia previa	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
ESTADIO pTx	TIS-I-II TIII-IV	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio pNx	pN- pN+	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio pMx	pM- pM+	P N.S	P N.S	P N.S
Carcinomatosis	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio TNM	I-II III-IV	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio Dukes	A-B C-D	P N.S	P N.S	P N.S
Invasión perineural	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Invasión linfovascular	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Progresión	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Mortalidad cáncer específica	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Mortalidad total	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S

Tabla 13: comparativa de las variables clínicopatológicas mediante las 3 técnicas de laboratorio.

4.2.2.- Relación del ADN plasmático prequirúrgico con DFS y OS

Se realizaron las curvas de supervivencia para establecer la posible correlación entre los niveles de ADN plasmático prequirúrgico obtenidos mediante las tres técnicas de laboratorio con los eventos de progresión y supervivencia total, y se observó que **el DFS se correlacionó de forma inversa y débil con los niveles prequirúrgicos de ADN plasmáticos obtenidos mediante PCR** (rho de Spearman: -0,292; $p= 0,021$) (figura 28). También se halló una débil e inversa correlación entre el OS y los niveles de ADN prequirúrgicos medidos por PCR (rho de Spearman: -0,401; $p<0,01$) (figura 29), lo que podría implicar que a mayores niveles de ADN prequirúrgicos obtenidos por PCR (en pg/ml), menor tiempo de progresión y supervivencia.

El resto de valores de ADN prequirúrgicos medidos por espectrofotometría y fluorimetría no se correlacionaron con el tiempo de progresión ni con el tiempo de supervivencia total.

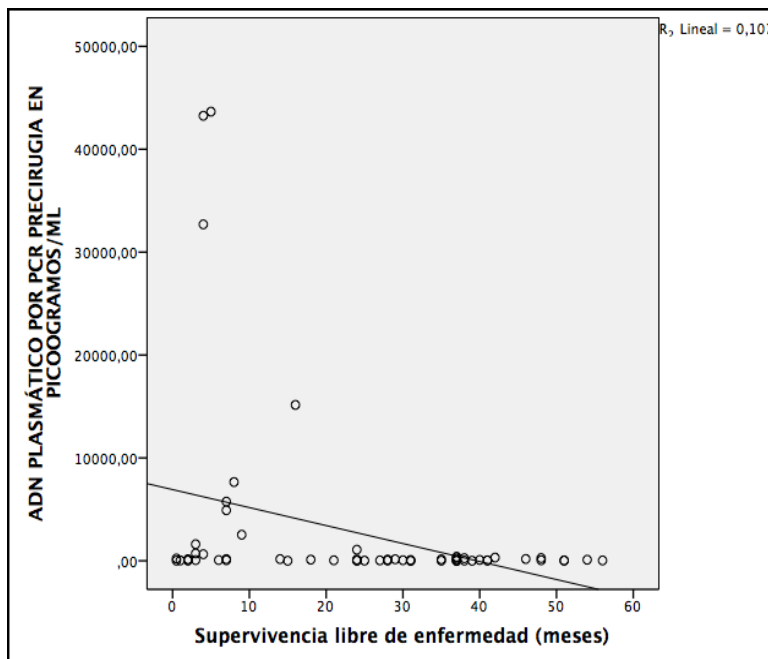


Figura 28: tiempo de progresión en meses.

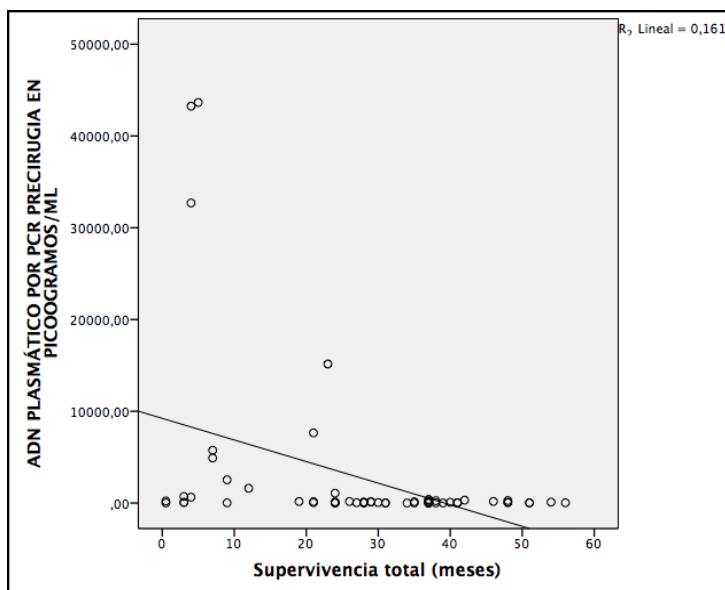


Figura 29: supervivencia total en meses.

4.2.3.- Análisis multivariante de supervivencia

Se realizó un análisis multivariante de **regresión logística** usando como variable dependiente la supervivencia. Se efectuaron distintos modelos introduciendo edad, sexo, estadio TNM (como variable dicotómica), localización, afectación ganglionar, mutación de *KRAS*, tratamiento quimioterápico, afectación linfática y presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Además se introdujeron por separado los valores de ADN plasmático total prequirúrgico medidos por PCR, por espectrofotometría y por fluorimetría. En todas las simulaciones realizadas, la única variable que permaneció en el modelo fue la existencia de metástasis en el momento del diagnóstico. De esta forma, **la existencia de metástasis multiplica por 13 el riesgo de progresión en el tiempo** (OR 13,714, IC95%: 2,936 – 64,066, $p < 0,001$). Este modelo presenta una sensibilidad del 56,3%, una especificidad del 91,4% y un porcentaje de bien clasificados del 80,4%. La variabilidad en la existencia de progresión explicada por la presencia de metástasis es del 32,1% (R^2 de Nagelkerke: 0,321).

		B	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
					Inferior	Superior
Paso 1 ^a	Metástasis	2,618	,001	13,714	2,936	64,066
	Constante	-1,520	,000	,219		

Se siguió la misma sistemática para la realización del **análisis multivariante de Cox**. En este caso, la variable dependiente fue el tiempo hasta la aparición de progresión de la enfermedad y se realizó otro con el tiempo total de supervivencia.

Usando como variable dependiente el tiempo de progresión, las únicas variables que permanecieron en el modelo de Cox fueron la presencia de metástasis y de carcinomatosis peritoneal al diagnóstico. La significación total del modelo (prueba Rao) obtuvo una Chi cuadrado de 37,024 con 2 grados de libertad ($p < 0,0001$). Según este modelo, existe un **aumento en la tasa instantánea del riesgo de progresar cuando hay metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (5,8 veces mayor) y cuando existe carcinomatosis peritoneal (4,2 veces mayor)**. Ninguna de los valores de ADN plasmático medido por los distintos métodos obtuvo significación en el modelo.

	B	ET	95,0% IC para Exp(B)	
			Inferior	Superior
Metástasis	1,771	,578	1,894	18,237
CARCINOMATOSIS	1,443	,764	1,007	18,917

Usando como variable dependiente el tiempo total de supervivencia, las únicas variables que permanecieron en el modelo de Cox fueron la presencia de carcinomatosis peritoneal al diagnóstico y la localización a nivel de sigma. La significación total del modelo (prueba Rao) obtuvo una Chi cuadrado de 18,540 con 2 grados de libertad ($p < 0,0001$). Según este modelo, existe un **aumento en la tasa instantánea del riesgo de morir cuando el tumor se localiza en sigma (8,3 veces mayor) y cuando existe carcinomatosis peritoneal (49,8 veces mayor)**. Ninguna de los valores de ADN plasmático medido por los distintos métodos obtuvo significación en el modelo.

	B	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
				Inferior	Superior
Paso 2 CARCINOMATOSIS	3,908	,002	49,798	4,141	598,846
LOCALIZACION	2,120	,053	8,328	,972	71,387

4.3.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL EN EL POSTOPERATORIO COMPARANDO LAS TRES TÉCNICAS EMPLEADAS

4.3.1.- Relación del ADN plasmático total con las variables clínicopatológicas

Se realizó posteriormente el mismo estudio para evaluar el valor clínico en la estadificación tumoral de la cuantificación del ADN total en el postoperatorio mediante las tres técnicas de laboratorio descritas y las distintas variables clínicopatológicas (ver anexo 2). En la siguiente tabla se destacan únicamente los resultados obtenidos en la comparación estadística (Tabla 14):

VARIABLES		PCR	Espectrofotometría	Fluorimetría
KRAS	No mutado Mutado	P N.S	P N.S	P N.S
Localización	Resto colon Sigma	P N.S	P N.S	P N.S
Neoplasia previa	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
ESTADIO pTx	TIS-I-II TIII-IV	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio pNx	pN- pN+	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio pMx	pM- pM+	P N.S	P N.S	P N.S
Carcinomatosis	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio TNM	I-II III-IV	P N.S	P N.S	P N.S
Estadio Dukes	A-B C-D	P N.S	P N.S	P N.S
Invasión perineural	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Invasión linfovascular	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Progresión	No Sí	P N.S	P N.S	P N.S
Mortalidad cáncer específica	No Sí	P N.S	P=0,019	P N.S
Mortalidad total	No Sí	P N.S	P=0,009	P N.S

Tabla 14: comparativa de las variables clínicopatológicas mediante las 3 técnicas de laboratorio.

Como recapitulación del estudio se obtuvo que **los pacientes que murieron por causa tumoral presentaron por espectrofotometría niveles significativamente inferiores de ADN total tras la cirugía (p 0,019)**. También se obtuvo que los **pacientes que murieron por cualquier causa ajena a la enfermedad cancerosa presentaron por espectrofotometría niveles significativamente menores de ADN total tras la cirugía (p 0,009)**. El estudio del resto de las variables no obtuvieron diferencias significativas.

4.3.2.- Relación del ADN plasmático postquirúrgico con *DFS* y *OS*

Del mismo modo que anteriormente se realizaron las curvas de supervivencia para establecer la posible correlación entre los niveles de ADN plasmático postquirúrgico obtenidos mediante las tres técnicas de laboratorio con los eventos de progresión y supervivencia total y se observó que **los niveles de ADN total postquirúrgico medidos por PCR en pg/ml, se correlacionaron de forma inversa y moderada con el *DFS* (rho de Spearman = -0,362; p= 0,004) (Figura 30) y con el *OS* (rho de Spearman= -0,434; p= 0,001) (Figura 31)**. Lo cual podría implicar que a mayores niveles de ADN postquirúrgicos obtenidos por PCR (en pg/ml), menor *DFS* y *OS*.

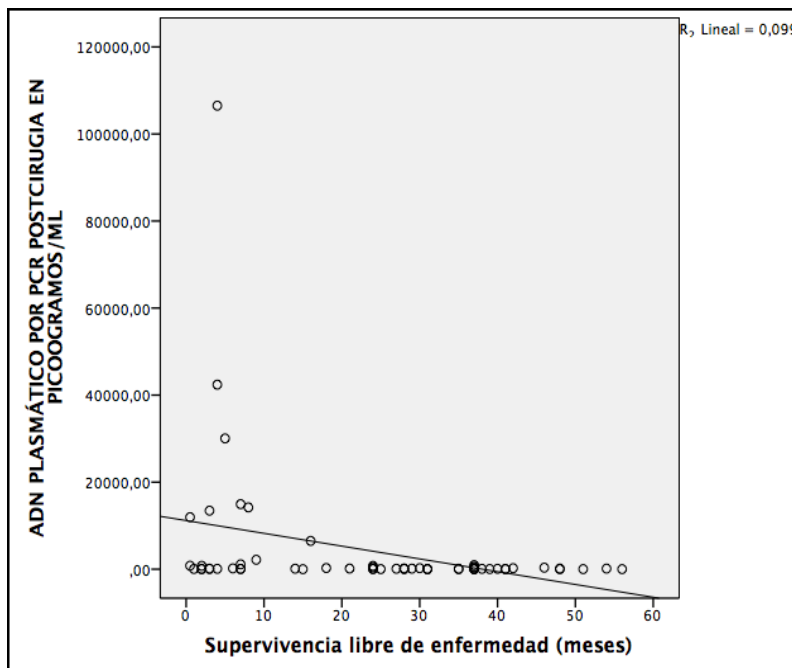


Figura 30: *DFS* por PCR expresada en meses.

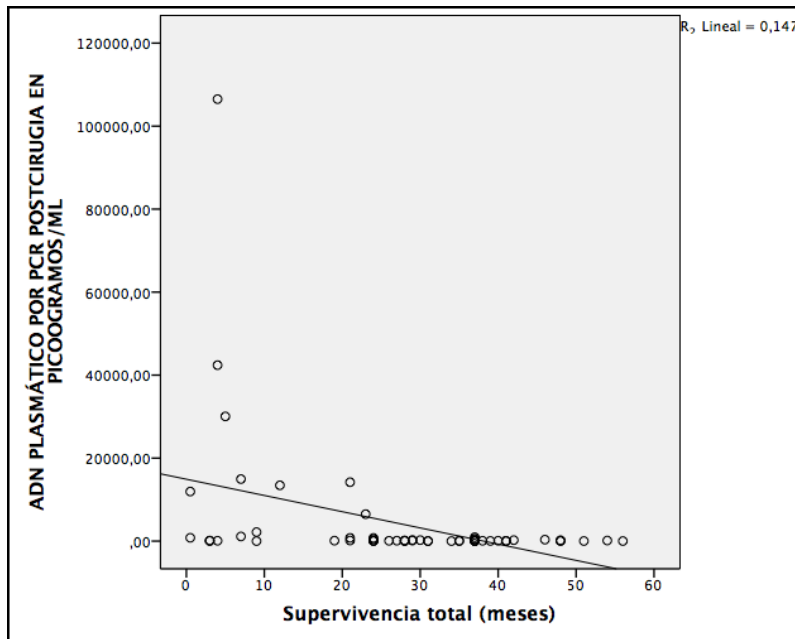


Figura 31: OS por PCR expresada en meses.

También se objetivó que **los niveles de ADN total postquirúrgico**, medidos por **fluorimetría**, se correlacionaron de **forma inversa y moderada con el OS** (rho de Spearman= -0,337; p= 0,015). Ello implica que a mayores niveles de ADN postquirúrgicos por fluorimetría, menor tiempo de supervivencia (Figura 32).

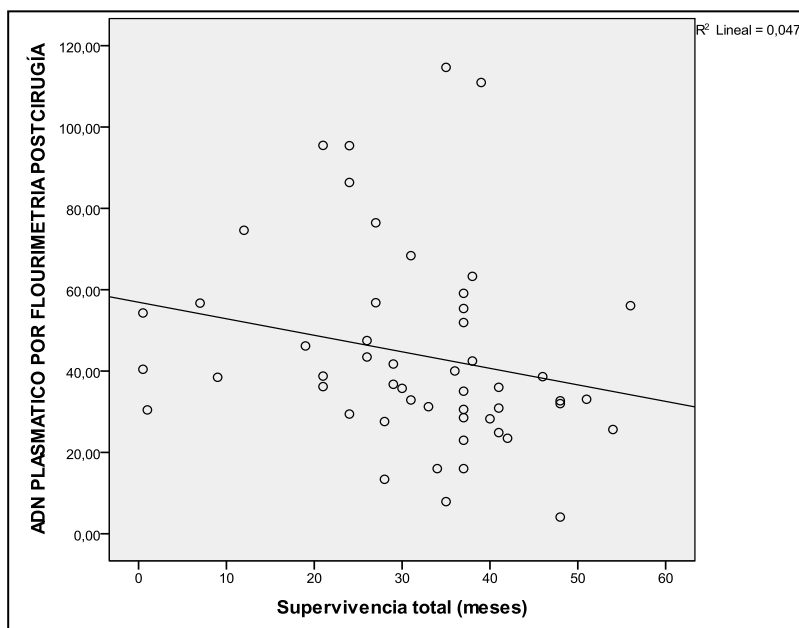


Figura 32: supervivencia total por fluorimetría expresada en meses.

Los valores de ADN postquirúrgicos medidos por espectrofotometría no se correlacionaron con el tiempo de progresión ni con el tiempo de supervivencia total.

4.3.3.- Análisis multivariante de supervivencia

Se realizó un análisis multivariante de **regresión logística** usando como variable dependiente la existencia de datos de progresión de la enfermedad. Se efectuaron distintos modelos introduciendo edad, sexo, estadio TNM (como variable dicotómica), localización, afectación ganglionar, mutación de *KRAS*, tratamiento quimioterápico, afectación ganglionar y presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Además se introdujeron por separado los valores de ADN total postquirúrgico medidos por PCR, por espectrofotometría y por fluorimetría. En todas las simulaciones realizadas, la única variable que permaneció en el modelo es la existencia de metástasis y afectación ganglionar en el momento del diagnóstico. De esta forma, la **existencia de metástasis multiplica por 8,5 el riesgo de progresión en el tiempo** (OR 8,501, IC95%: 1,861 – 38,837, $p= 0,006$) y la existencia de **afectación ganglionar aumenta el riesgo de progresión más de 5 veces** (OR 5,720; IC 95%: 1,052 – 31,094). Este modelo presenta una sensibilidad del 46,7%, una especificidad del 91,1% y un porcentaje de bien clasificados del 81,7%. La variabilidad en la existencia de progresión explicada por la presencia de metástasis y afectación ganglionar es del 37% (R^2 de Nagelkerke: 0,370).

		B	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
					Inferior	Superior
b	METÁSTASIS	2,140	,006	8,501	1,861	38,837
	ADENOPATÍAS	1,744	,044	5,720	1,052	31,094
	Constante	-2,865	,000	,057		

Se siguió la misma sistemática para realizar un **análisis multivariante de Cox**. En este caso, la variable de pendiente fue el tiempo hasta la aparición de progresión de la enfermedad y se realizó otro con el tiempo total de supervivencia.

Usando como variable dependiente el tiempo de progresión, las únicas variables que permanecieron en el modelo de Cox fueron la presencia de metástasis, carcinomatosis peritoneal al diagnóstico y estadio tumoral. La significación total del

modelo (prueba Rao) obtuvo una Chi cuadrado de 44,751 con 3 grados de libertad ($p < 0,0001$). Según este modelo, existe un **aumento en la tasa instantanea del riesgo de progresar cuando hay metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (3,9 veces mayor), cuando existe carcinomatosis peritoneal (13 veces mayor), cuando hay afectación ganglionar (10 veces mayor)**. Ninguna de los valores de ADN precirugía medido por los distintos métodos obtuvo significación en el modelo.

	B	Sig.	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
				Inferior	Superior
METÁSTASIS	1,376	,021	3,957	1,226	12,768
CARCINOMATOSIS	2,612	,004	13,627	2,312	80,333
ADENOPATÍAS	2,376	,005	10,764	2,066	56,070

Usando como variable dependiente el tiempo total de supervivencia, las variables que permanecieron en el modelo de Cox fueron la presencia de carcinomatosis peritoneal, la existencia de otras neoplasias previas, la presencia de metástasis al diagnóstico, la presencia de afectación ganglionar y el haber seguido tratamientos quimioterápicos adyuvantes. La significación total del modelo (prueba Rao) obtuvo una Chi cuadrado de 29,707 con 5 grados de libertad ($p < 0,0001$). Según este modelo, existe un **aumento en la tasa instantanea del riesgo de morir cuando había metástasis al diagnóstico (29 veces mayor), cuando existían otras neoplasias previas (44 veces mayor), cuando existía carcinomatosis peritoneal (12 veces mayor) y cuando había afectación ganglionar (133 veces mayor)**. El haber seguido tratamiento con quimioterapia adyuvante se comportó como un **factor protector del riesgo de mortalidad (OR: 0,007)**. Ninguna de los valores de ADN plasmáticos medido por los distintos métodos obtuvo significación en el modelo.

		B	ET	Exp(B)	95,0% IC para Exp(B)	
					Inferior	Superior
Paso	METÁSTASIS	3,388	1,460	29,604	1,693	517,749
	CARCINOMATOSIS	2,519	1,409	12,415	1,001	196,443
	NEOPLASIA PREVIA	3,798	1,430	44,627	2,708	735,486
	QUIMIOTERAPIA	-4,951	1,844	,007	,000	,263
	ADENOPATÍAS	4,894	1,654	133,515	5,222	3413,619

4.4.- COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ADN PLASMÁTICO PERIOPERATORIO MEDIANTE LOS DISTINTOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Antes de analizar pormenorizadamente los datos obtenidos con cada técnica de laboratorio por separado se estudió la posible correlación entre los valores obtenidos mediante cada uno de los procedimientos al ser comparados entre sí, como se muestra en la Tabla 15.

MÉTODO CUANTIFICACIÓN	ADN PREOPERATORIO	ADN POSTOPERATORIO
PCR (en pg/ml) +Media +Mediana +Mínimo +Máximo	2731 (IC95%: 411,9-5050) 78 2,7 43650	4196,5 (IC95%: 247,5-8145,5) 112 5,1 106494
FLUORIMETRÍA +Media +Mediana +Mínimo +Máximo	36,5 (IC95%: 31,7-41,4) 32,6 4,2 77,7	44,1 (IC95%: 37,4-50,9) 37,6 4,1 114,7
ESPECTROFOTOMETRÍA (en ng/ml) +Media +Mediana +Mínimo +Máximo	4,3 (IC95%: 2,5-6,1) 2,6 0,1 53,6	6,8 (IC95%: 3-10,7) 3,4 0,2 114,5

Tabla 15: ADN plasmático total pre y postoperatorio medido por PCR, fluorimetría y espectrofotometría.

Los valores obtenidos por **PCR no siguieron una distribución normal** (Z de Kolmogorov-Smirnov 3,350 para muestras preoperatorias y 3,259 para postoperatorias; $p < 0,0001$).

Los valores obtenidos por **fluorimetría siguieron una distribución normal** (Z de Kolmogorov-Smirnov 0,782 para muestras preoperatorias, y 1,190 para postoperatorias; p n.s.).

Los valores obtenidos por **espectrofotometría no siguieron una distribución normal** (Z de Kolmogorov-Smirnov 2,459 para muestras preoperatorias y 2,833 para postoperatorias; $p < 0,0001$).

En la valoración de la posible correlación entre los valores de ADN plasmático total prequirúrgico medidos por los diversos métodos de análisis, se obtuvo que los niveles de ADN obtenidos por PCR no se correlacionaron con los niveles obtenidos por espectrofotometría (rho de Spearman: 0,135; $p = \text{n.s.}$) ni con los obtenidos por fluorimetría (rho de Spearman: 0,244; $p = \text{n.s.}$). Tampoco hubo correlación entre los niveles de ADN plasmático obtenidos por espectrofotometría con los obtenidos por fluorimetría (rho de Spearman: 0,096; $p = \text{n.s.}$). Por tanto, **no se observó ninguna correlación entre los niveles prequirúrgicos de ADN plasmático total obtenidos mediante las distintas técnicas de laboratorio.**

En cuanto a la correlación de dichos valores en el postoperatorio se observó que únicamente **los niveles obtenidos por PCR se correlacionaron levemente con los niveles de ADN postcirugía obtenidos por espectrofotometría (rho de Spearman: 0,337; $p < 0,001$);** sin embargo, no hubo correlación con los niveles obtenidos por fluorimetría (rho de Spearman: 0,170; $p = \text{n.s.}$). Tampoco hubo correlación entre los obtenidos por espectrofotometría con los obtenidos por fluorimetría (rho de Spearman: 0,038; $p = \text{n.s.}$).

4.5.- RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ADN PLASMÁTICO PERIOPERATORIO CON VARIABLES CLÍNICAS Y PRONÓSTICO

En este apartado se muestra el análisis de los resultados obtenidos de la cuantificación del ADN plasmático total en el perioperatorio. Se determinó su posible valor clínico en relación con las variables clínicopatológicas del estudio y se correlacionaron con los datos de progresión y de supervivencia para evaluar el posible valor pronóstico de cada una de las tres técnicas de laboratorio por separado.

4.5.1.- Relación de los niveles de ADN perioperatorio determinados por PCR

Se estudiaron las diferencias en la cuantificación de ADN total perioperatoria medidas en pg/ml, cuyas determinaciones se muestran en la tabla 16.

PCR	Media	Desviación típica	IC 95%	P
ADN plasmático precirugía/ ADN plasmático postcirugía por PCR en pg/ml	-1465,515	8898,146	-3764,150-833,120	N.S

Tabla 16: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

No hubo diferencias significativas ente los niveles de ADN plasmático total medido en pg/ml antes y después de la cirugía, aunque hubo un aumento medio de 1465,51 pg/ml. Un total de 36 pacientes (60%) aumentaron estos niveles tras la intervención. El aumento medio en estos pacientes fue de 3259,07 (IC95%: 6937,07 - -418,93). Los 24 pacientes (40%) en los que los niveles de ADN por PCR disminuyeron, lo hicieron en una media de 1224,81 (IC95%: -156,59 – 2606,2). El porcentaje de variación medio de los niveles de ADN total plasmático por PCR fue del -335,34% (IC95%: -607,22 - -63,46), con una mediana de -31,2 y un mínimo y máximo de -5258,7 y 86,8 respectivamente.

✓ **Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio por PCR con las variables clinicopatológicas**

Se elaboraron tablas de contingencia para estudiar dichas variaciones de ADN plasmático total en el perioperatorio con respecto a diversas variables clinicopatológicas, donde **no se observaron diferencia significativas entre los valores obtenidos mediante PCR y las variables de estudio**

✓ **Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio por PCR con la supervivencia**

Se estudió la relación de los niveles de ADN plasmático obtenidos por PCR con el DFS o progresión, y los resultados del estudio de dicha relación se reflejan en la tabla 17. Con los datos se elaboraron las curvas de **supervivencia libre de enfermedad** (Figura 33), en los que **no se observaron diferencias significativas**.

PCR	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTAN ADN	41,3	34,2 - 48,4	N.S
+ DISMINUYEN ADN	42,3	33 - 51,5	
+ GLOBAL	42,6	36,8 - 48,4	

Tabla 17: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

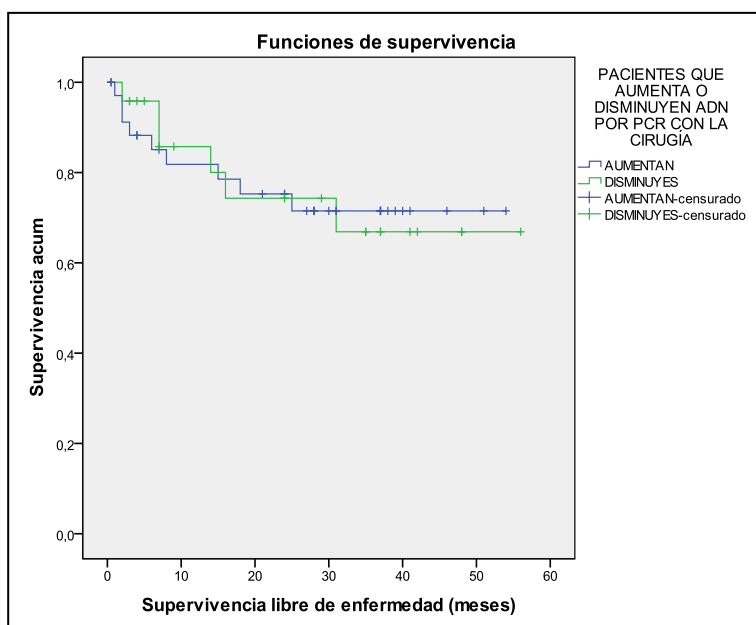


Figura 33: curvas de supervivencia libre de enfermedad expresadas en meses obtenidas de las determinaciones por PCR.

También se estudió la relación con el **tiempo de supervivencia total**, y los resultados del estudio de dicha relación se reflejan en la tabla 18. Con los datos se elaboraron las curvas de tiempo de supervivencia total que se muestran en la figura 34, en los que igualmente **no se observaron diferencias significativas**.

PCR	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTA ADN	45,6	40 – 51,2	N.S
+ DISMINUYE ADN	51,5	45,6 – 57,4	
+ GLOBAL	48,6	44,3 – 53	

Tabla 18: evolución de los niveles de ADN plasmático durante el perioperatorio, valorada mediante la agrupación de los pacientes en tres grupos, según aumentaran, bajaran o se mantuvieran estos niveles.

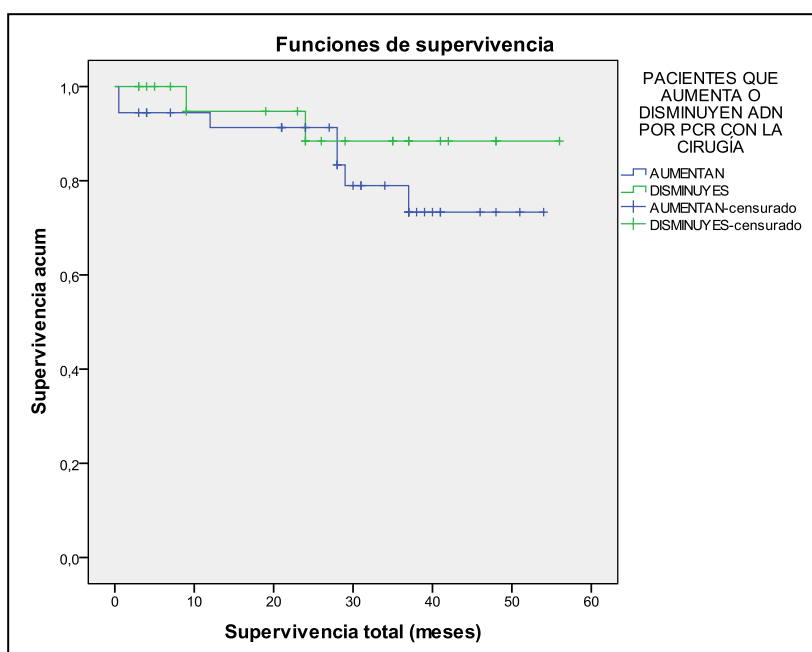


Figura 34: curvas de supervivencia total expresadas en meses obtenidas de las determinaciones por PCR.

Al estudiarse también las correlaciones del **OS y DFS con el porcentaje de variación de ADN** en el perioperatorio se observó que había una correlación moderada entre el porcentaje de variación en pacientes aumentan los niveles de ADN por PCR tras la cirugía y la supervivencia total ($r= 0,450$; $p< 0,012$), de modo que **a menor porcentaje de aumento de ADN, mayor supervivencia**, como se observa en la siguiente Figura 35. Con el resto de variables no se encontraron asociación significativa.

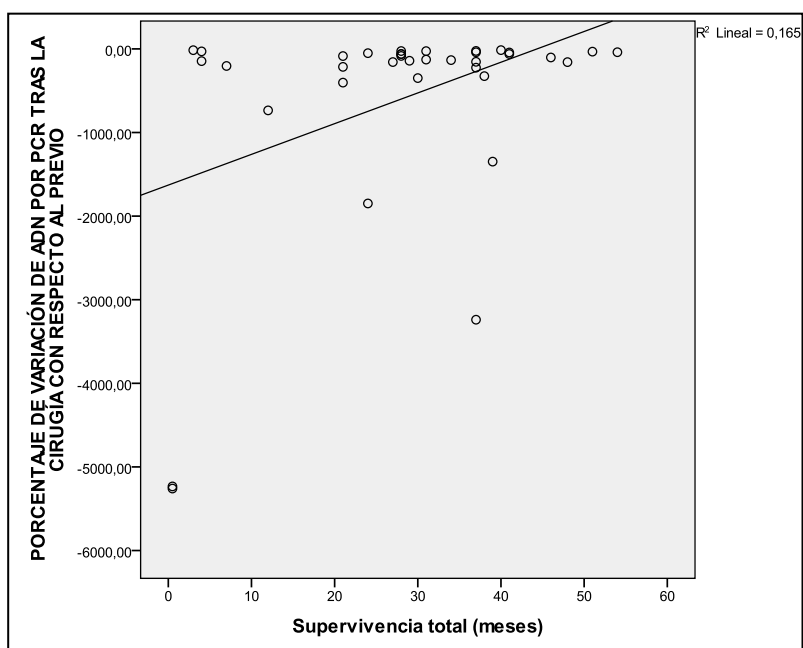


Figura 35: correlación entre el porcentaje de variación de ADN y el tiempo de supervivencia total expresado en meses.

4.5.2.- Relación de los niveles de ADN perioperatorio medidos mediante espectrofotometría

Se estudiaron las diferencias en la cuantificación de ADN total perioperatoria medidas en ng/ml mediante esta técnica, cuyas determinaciones se muestran en la tabla 19.

ESPECTROFOTOMETRÍA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	IC 95%	P
ADN PLASMÁTICO PRECIRUGÍA/ ADN PLASMÁTICO POSTCIRUGÍA POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN NG/ML	2,524	16,109	-6,516 - 1,467	N.S

Tabla 19: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

No hubo diferencias significativas entre los niveles de ADN total plasmático medido por espectrofotometria antes y después de la cirugía, aunque hubo un aumento medio de 2,52423 (IC95%: -6,515 – 1,467) ng/ml, con una mediana de – 1,21

y unos límites mínimo y máximo de $-112,2$ y $-0,03$ respectivamente. Un total de 35/65 pacientes (53,8%) aumentaron estos niveles tras la intervención. El aumento medio en estos pacientes fue de 7,1634 (IC95%: $-14,16 - -0,167$). Los 30 pacientes (46,2%) en los que los niveles de ADN por espectrofotometría disminuyeron, lo hicieron en una media de 2,88 (IC95%: $0,861 - 4,914$), con una mediana de 1,3 y un mínimo y máximo de 0,04 y 29,4 respectivamente. El porcentaje de variación medio de los niveles de ADN plasmático total por espectrofotometría fue del -223,40% (IC95%: $-456,01 - 9,201$).

✓ **Relación entre los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por espectrofotometría y las variables clinicopatológicas**

Se elaboraron las correspondientes tablas de contingencia para estudiar dichas variaciones de ADN plasmático total en el perioperatorio con respecto a diversas variables clinicopatológicas, y donde **no se observaron diferencias significativas con ninguna de las variables de estudio.**

✓ **Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por espectrofotometría y la supervivencia**

Se estudiaron las relaciones de los niveles de ADN por espectrofotometría en el perioperatorio con la **supervivencia libre de enfermedad** o progresión, y los resultados del estudio se reflejan en la tabla 20. Con los datos se elaboraron las curvas de *DFS* que se muestra a continuación (Figura 36), donde **tampoco se observaron diferencias significativas.**

ESPECTROFOTOMETRÍA	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTA ADN	39,7	33,4 - 46	N.S
+ DISMINUYE ADN	41	32,4 - 49,6	
+ GLOBAL	42,1	36,5 - 47,7	

Tabla 20: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

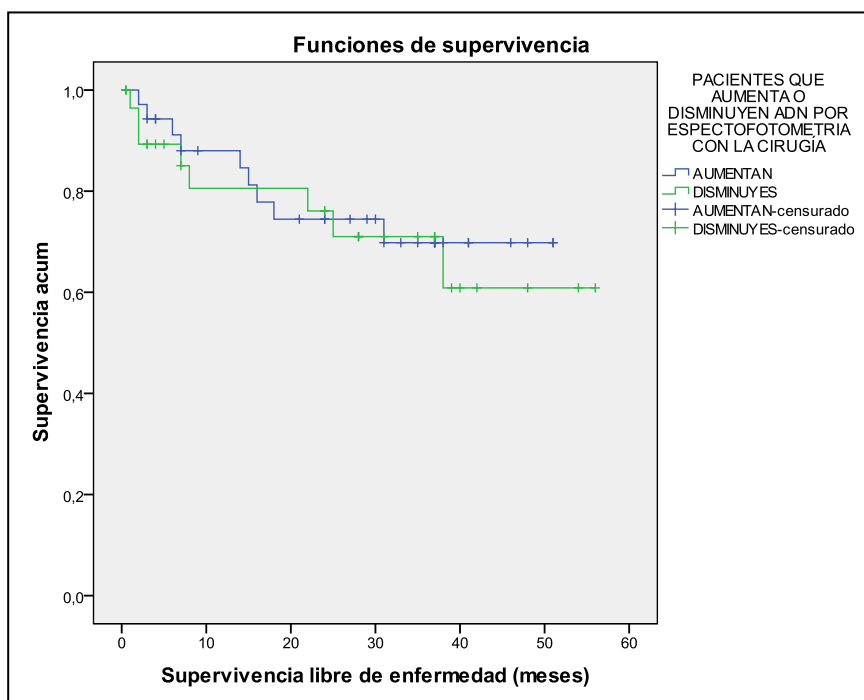


Figura 36: curvas de DFS expresadas en meses obtenidas de las determinaciones por espectrofotometría.

También se estudiaron los resultados en relación con el **tiempo de supervivencia total**, y los datos obtenidos se reflejan en la tabla 21. Con ellos se elaboron las curvas de tiempo de supervivencia total (Figura 37), donde **no se observaron diferencias significativas**.

ESPECTROFOTOMETRÍA	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTA ADN	47,6	44 – 51,3	N.S
+ DISMINUYE ADN	44,7	37,5 – 51,8	
+ GLOBAL	48,6	44,4 – 52,8	

Tabla 21: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

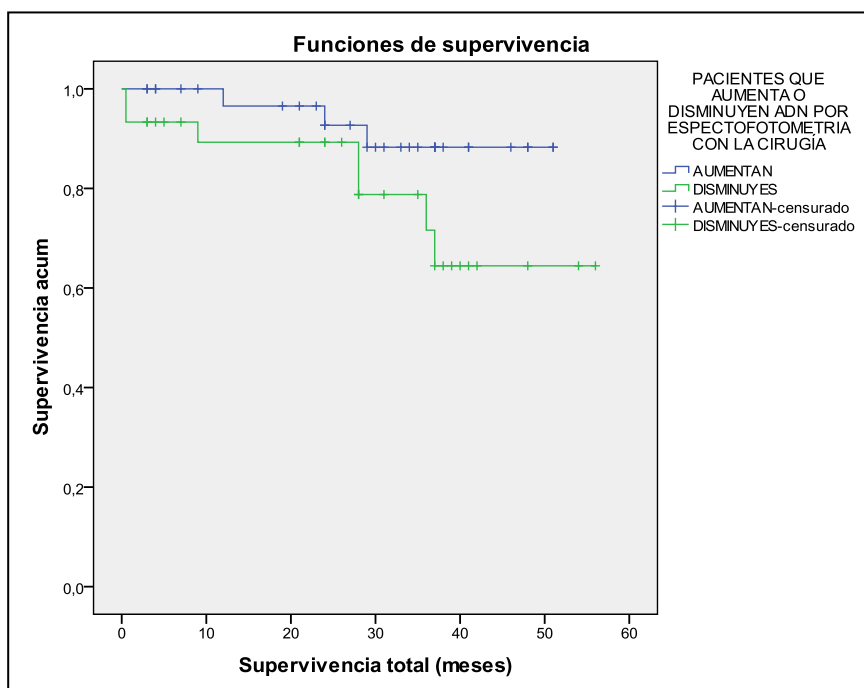


Figura 37: curvas de OS expresadas en meses obtenidas de las determinaciones por espectrofotometría.

Al estudiar las **correlaciones entre tiempo de progresión y de supervivencia total con el porcentaje de variación de ADN** en pacientes que disminuyen o que aumentan ADN plasmático tras la cirugía, **no hubo ninguna asociación significativa.**

4.5.3.- Relación de los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos mediante fluorimetría

Se estudiaron las diferencias en la cuantificación de ADN total perioperatoria, cuyas determinaciones se muestran en la tabla 22.

FLUORIMETRÍA	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	IC 95%	P
ADN PLASMÁTICO PRECIRUGÍA/ ADN PLASMÁTICO POSTCIRUGÍA POR FLUORIMETRÍA	-7,619	12,120	-10,993 - -4,244	P < 0,0001

Tabla 22: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

Los niveles de ADN plasmático medidos por fluorimetría fueron significativamente más altos después de la cirugía, con un aumento medio de 7,619231 (IC95%: -10,993 – -4,244). Un total de 38 pacientes (73,1%) aumentaron estos niveles tras la intervención. El aumento medio en estos pacientes fue de 12,368 (IC95%: -15,800 - -8,936), con una mediana de -11,3 y un mínimo y máximo de -48,4 y -0,01 respectivamente. Los 14 pacientes (26,9%) en los que los niveles de ADN por fluorimetría disminuyeron, lo hicieron en una media de 5,27 (IC95%: 2,61 – 7,92), con una mediana de 4,5 y un mínimo y máximo de 0,02 y 14,02 respectivamente. El porcentaje de variación medio de los niveles de ADN total plasmático por fluorimetría fue del -25,95% (IC95%: -38,50 – -13,40).

✓ **Relación entre los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por fluorimetría y las variables clinicopatológicas**

Se elaboraron las correspondientes tablas de contingencia para estudiar dichas variaciones de ADN plasmático total en el perioperatorio con respecto a las variables clínicopatológicas, **sin observar diferencias significativas.**

✓ **Relación entre los niveles de ADN plasmático perioperatorio medidos por fluorimetría y la supervivencia**

Se estudió la relación de los niveles de ADN obtenidos por fluorimetría con el **tiempo libre de enfermedad o progresión**, y los resultados obtenidos del estudio de dicha relación se reflejan en la siguiente tabla 23. Con los datos se elaboraron las curvas de tiempo de supervivencia libre de enfermedad (Figura 38), **sin observar diferencias significativas.**

FLUORIMETRÍA	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTA ADN	40,4	33,1 – 47,7	N.S
+ DISMINUYE ADN	36,8	27,3 – 46,2	
+ GLOBAL	41,1	35 – 47,2	

Tabla 23: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

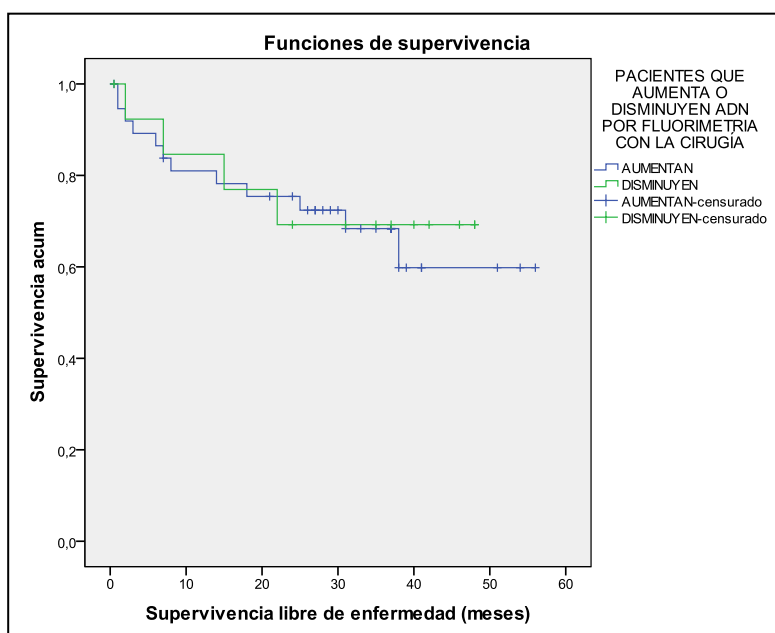


Figura 38: curvas de DFS expresadas en meses obtenidas de las determinaciones por fluorimetría.

También con los resultados obtenidos se estudió la relación con el **tiempo de supervivencia total**, y los datos de dicha relación se reflejan en la tabla 24. Con los datos se elaboraron las curvas de tiempo de supervivencia total (Figura 39), donde **no se observaron diferencias significativas**.

FLUORIMETRÍA	MEDIA	IC 95%	P
+ AUMENTA ADN	47	41,6 – 52,6	N.S
+ DISMINUYE ADN	40,4	32,2 – 48,5	
+ GLOBAL	47	42,1 – 51,8	

Tabla 24: relación entre los valores de ADN plasmático pre y postoperatorios.

Al estudiarse igualmente las posibles **correlaciones entre el tiempo de progresión y de supervivencia total con el porcentaje de variación de ADN** tras la cirugía **no hubo ninguna asociación significativa.**

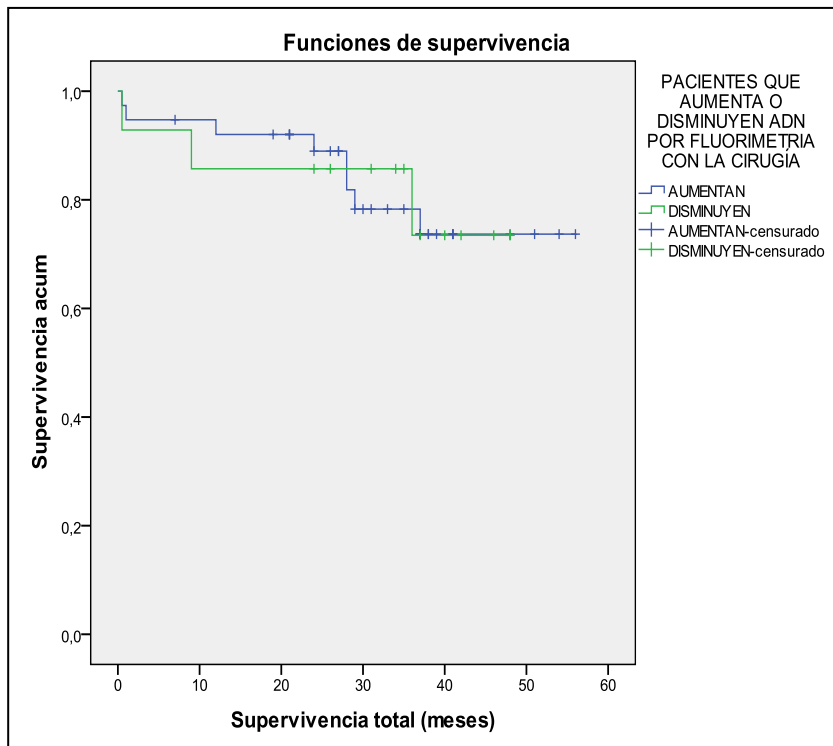


Figura 39: curvas de OS expresadas en mese obtenidas de las determinaciones por fluorimetría.

4.6.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES *KRAS* EN TEJIDO TUMORAL

Previamente al análisis de la detección de las mutaciones en el ADN plasmático se estudiaron las muestras de tejidos tumorales. En la tabla 25 se presentan los resultados de estos análisis moleculares, así como su posible relación clínica y pronóstica. Como puede observarse, solamente presentaron alguna mutación de *KRAS* en el análisis de tejido tumoral 17 de los 71 pacientes que se integraron en el estudio, lo que supone un **24%** del total, de los cuales la mutación GAT fue la más frecuentemente hallada. No se hallaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de *KRAS* y la edad.

	MUTACIÓN	N	FRECUENCIA
NO MUTADO	-	71	100%
MUTADO	GAT	11	15,5%
	TGT	2	2,8%
	GTT	3	4,2%
	GCT	1	1,4%

Tabla 25: resumen de los principales datos de detección de mutaciones *KRAS* en tejidos tumorales.

4.6.1.- Relación de la detección de *KRAS* mutado con las variables clinicopatológicas

Para determinar el posible valor clínico de la determinación de *KRAS* en el tumor se elaboraron las correspondientes tablas de contingencia que estudiaron la asociación entre la detección de *KRAS* y las distintas variables clinicopatológicas. Como dato más significativo se destaca que **la existencia de metástasis al diagnóstico son más frecuentes en pacientes con *KRAS* mutado** respecto a pacientes portadores de *KRAS* nativo (47,1% vs 11,1%), dato que obtiene significación estadística (**p < 0,002**).

4.6.2.- Relación de la detección de *KRAS* mutado con la supervivencia

Por otra parte, para la valoración de la importancia de la determinación de *KRAS* tumoral en el pronóstico se utilizaron los resultados del estudio de dicha relación con el *OS*, *DFS* y tiempo de supervivencia cáncer específica.

Se estudió la relación de la detección de *KRAS* mutado con la *OS* (tabla 26). Con ellos se elaboraron las **curvas de supervivencia** (Figura 40), donde **no se observaron diferencias significativas**.

ESTADO DE <i>KRAS</i>	MEDIA	IC 95%	P
+ NO MUTADO	48,2	43,5 – 52,8	N.S
+ MUTADO	37,8	33,3 - 42,4	
+ GLOBAL	48,4	44,3 – 52,5	

Tabla 26: relación de la detección de *KRAS* en tejido tumoral con la *OS*.

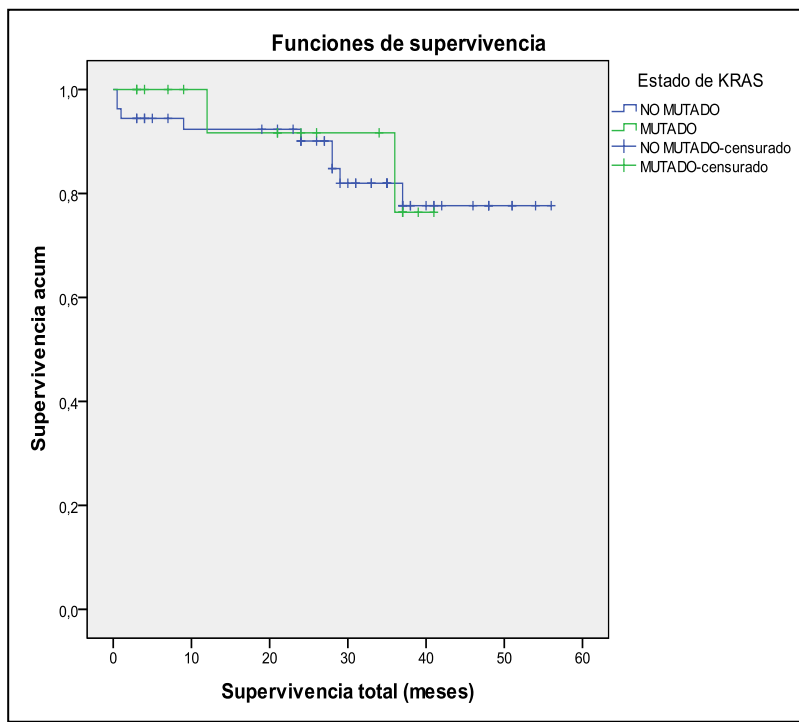


Figura 40: curvas de *OS* en relación a la determinación *KRAS* en tejido tumoral.

También se estudió la relación de la detección de *KRAS* mutado para el estudio del *DFS* (tabla 27). En este caso dicha relación alcanzó significación estadística, de modo que los pacientes con ***KRAS* mutado tuvieron un *DFS* significativamente inferior ($p < 0,05$)**, como puede comprobarse en las curvas de supervivencia libre de enfermedad que se muestra a continuación (Figura 41).

ESTADO DE <i>KRAS</i>	MEDIA	IC 95%	P
+ NO MUTADO	43,7	38 – 49,4	P<0,05
+ MUTADO	25,5	17 – 34,1	
+ GLOBAL	41,2	35,9 – 46,6	

Tabla 27: relación de la detección de *KRAS* en tejido tumoral con la *DFS*.

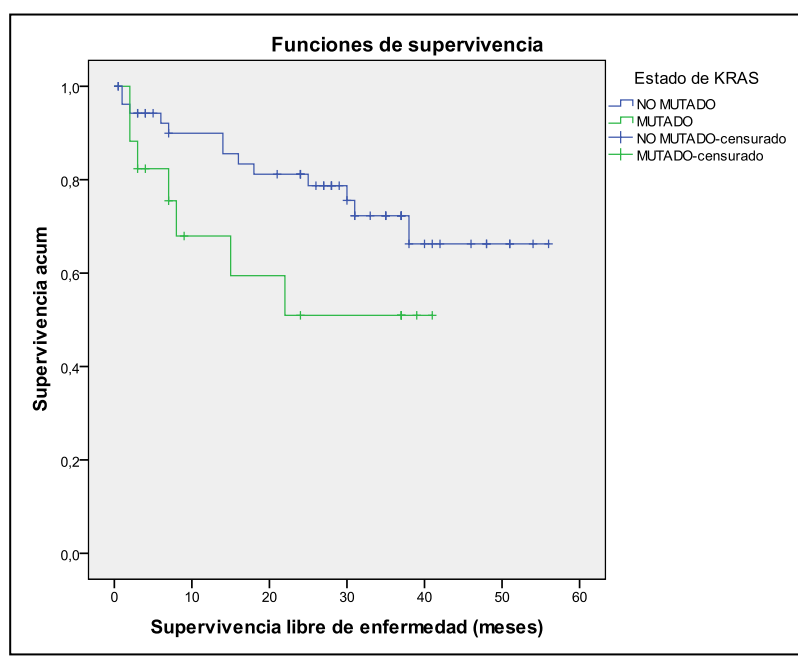


Figura 41: curvas de *DFS* en relación a la determinación de *KRAS* mutado en tejido tumoral.

Por ultimo, se estudió la relación con la **supervivencia específica por cáncer** (tabla 28). Con los datos se elaboraron las curvas de supervivencia que se muestra a continuación (Figura 42), **sin que se hallasen diferencias significativas**.

ESTADO DE KRAS	MEDIA	IC 95%	P
+ NO MUTADO	51,6	47,9 – 55,3	N.S
+ MUTADO	37,8	33,2 – 42,4	
+ GLOBAL	51	47,6 – 54,5	

Tabla 28: relación de la detección de KRAS en tejido tumoral con la OS.

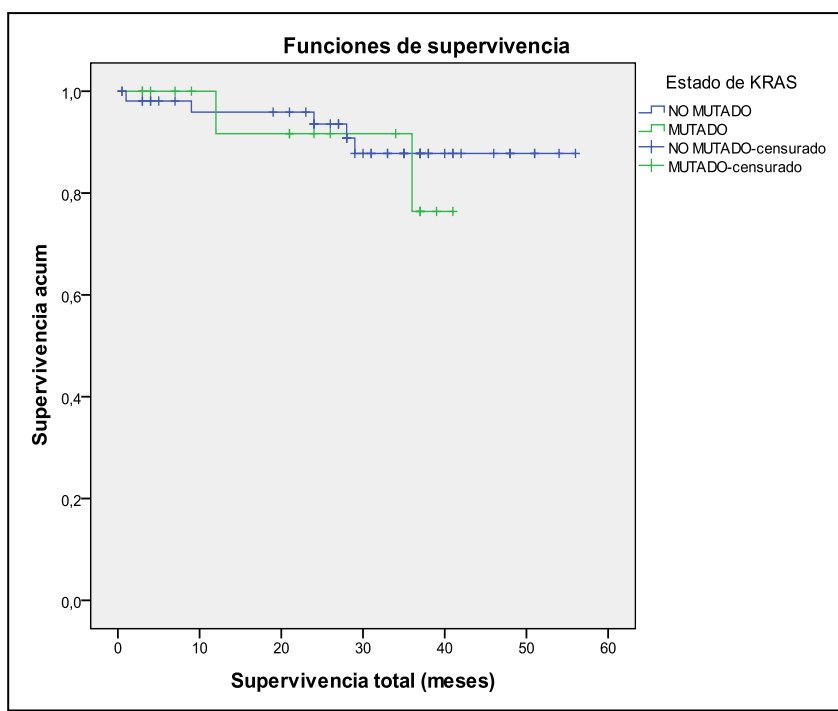


Figura 42: curvas de OS para el tiempo de progresión en relación a la determinación de KRAS mutado en tejido tumoral.

4.7.- VALOR CLÍNICO Y PRONÓSTICO DE LA DETERMINACIÓN DE ADN MUTADO EN PLASMA EN EL PERIOPERATORIO

En este apartado se analizaron los datos obtenidos tras la detección por PCR de ADN mutado específicamente. Se determinó el posible valor clínico de los valores obtenidos al cotejarlos con las variables clínicopatológicas en el preoperatorio y postoperatorio respectivamente, y se evaluó el valor pronóstico mediante el estudio de la supervivencia total y cáncer específica. Finalmente se presentan los resultados más destacables de los cambios en la determinación de ADN mutado durante el perioperatorio con respecto a variables clínicas como el estadio tumoral, la presencia de metástasis al diagnóstico, carcinomatosis peritoneal y progresión de la enfermedad tumoral.

4.7.1.- Existencia de ADN mutado en plasma

De los 17 pacientes con *KRAS* mutado en tejido tumoral, únicamente hubo un caso con una mutación poco frecuente (T84: mutación CGT) en el que no se pudo realizar esta determinación por carecer de las sondas específicas para su detección por PCR. De las 16 muestras restantes, en 8 (50%) se pudo detectar la presencia de ADN mutado en plasma antes de la cirugía y en otros 8 (50%) tras la intervención en alguna de las 6 réplicas determinadas por PCR.

De los 8 pacientes en los que no se detectó ADN antes de la cirugía, tras la intervención:

- 4 persistieron como negativos.
- 4 presentaron ADN tumoral tras la cirugía.

De los 8 pacientes con en los que sí se detectó ADN antes de la cirugía, tras la intervención:

- 4 persistieron como positivos.
- 4 negativizaron el ADN tumoral.

Los resultados de estas determinaciones plasmáticas por PCR en el perioperatorio quedan reflejados en la tabla 29:

MUESTRA	PREOPERATORIO		POSTOPERATORIO	
T72	-	0/6	+	1/6
T87	-	0/6	+	1/6
T89	+	1/6	-	0/6
T92	+	5/6	+	2/6
T110	+	6/6	-	0/6
T112	+	1/6	+	1/6
T113	+	1/6	-	0/6
T116	+	3/6	+	3/6
T118	-	0/6	-	0/6
T121	-	0/6	+	3/6
T124	+	5/6	+	4/6
T129	-	0/6	-	0/6
T136	-	0/6	-	0/6
T145	-	0/6	-	0/6
T149	+	6/6	-	0/6
T150	-	0/6	+	3/6
N = 16	N = 8		N = 8	

Tabla 29: resumen de los datos de detección de KRAS mutado en plasmas mediante PCR. Los valores se expresan en número de réplicas positivas sobre un total de 6 determinaciones.

4.7.2.- Valor clínico de la determinación de ADN plasmático tumoral antes de la cirugía

Para evaluar el valor clínico de la determinación de ADN plasmático tumoral se realizaron los análisis estadísticos mediante la comparación de medias y tablas de contingencia para determinar las posibles relaciones entre la presencia de mutaciones de *KRAS* en el ADN plasmático preoperatorio con las distintas variables clínicopatológicas, , **sin observar diferencias significativas**. La edad tampoco presentó diferencias significativas con la determinación de ADN mutado.

4.7.3.- Relaciones de detección de *KRAS* plasmático tumoral prequirúrgico con el OS

En cuanto a la determinación en el pronóstico se estudió el **OS** y **no se encontraron diferencias significativas** en el estudio de la relación de las mutaciones plasmáticas de *KRAS*, cuyos resultados se muestran en la tabla 30.

ADN PLASMÁTICO MUTADO	MEDIA	IC 95%	P
+ <i>KRAS</i> NO MUTADO	32,2	20,8 – 43,7	N.S
+ <i>KRAS</i> MUTADO	39,7	37,6 – 41,9	
+ GLOBAL	37,5	32,4 – 42,5	

*Tabla 30: relación de la detección de *KRAS* plasmático mutado con la OS.*

Igualmente, las relaciones con el **tiempo de supervivencia cáncer específica** **tampoco mostraron diferencias significativas** en la relación de las mutaciones plasmáticas de *KRAS* y cuyos resultados se muestran en la tabla 31.

ADN PLASMÁTICO MUTADO	MEDIA	IC 95%	P
+ <i>KRAS</i> NO MUTADO	33	22,3 – 43,7	N.S
+ <i>KRAS</i> MUTADO	37,2	30,5 – 43,9	
+ GLOBAL	35,3	28,3 – 42,4	

*Tabla 31: relación de la detección de *KRAS* plasmático mutado con el tiempo de supervivencia cáncer específica.*

4.7.4.- Valor clínico de la determinación de ADN plasmático tumoral después de la cirugía

Se realizaron los mismos análisis estadísticos mediante la comparación de medias y tablas de contingencia para determinar las posibles relaciones entre la presencia de mutaciones de *KRAS* en el ADN plasmático postoperatorio con las distintas variables clínicopatológicas, como se muestra en la tabla 36. La edad en este caso tampoco presentó diferencias significativas con la determinación de ADN mutado.

Los datos más relevantes obtenidos de este análisis y que presentaron significación estadística fueron que el **75% de los pacientes con ADN tumoral tras la cirugía presentan metástasis al diagnóstico** frente a un 25% sin presencia de ADN tumoral tras la intervención, resultado ($p < 0,05$); y que el **75% de los pacientes con ADN tumoral tras la cirugía progresan** frente a un 12,5% de los que no tiene ADN tumoral tras la intervención ($p = 0,041$). Los datos más significativos se recogen en la tabla 32.

		KRAS MUTADO POSTOPERATORIO		p
		NEGATIVO	POSITIVO	
SEXO	HOMBRE MUJER	6 (75%) 2 (25%)	5 (62,5%) 3 (37,5%)	N.S
ESTADIO pT	TIS-I-II TIII-IV	2 (25%) 6 (75%)	0 (0%) 8 (100%)	N.S
GANGLIOS AFECTOS	NO SÍ	3 (37,5%) 5 (62,5%)	1 (12,5%) 7 (87,5%)	N.S
METÁSTASIS	NO SÍ	6 (75%) 2 (25%)	2 (25%) 6 (75%)	P<0,05
CARCINOMATOSIS PERITONEAL	NO SÍ	8 (100%) 0 (0%)	7 (87,5%) 1 (12,5%)	N.S
LOCALIZACIÓN SIGMA VS RESTO COLON	SIGMA RESTO COLON	4 (50%) 4 (50%)	2 (25%) 6 (75%)	N.S
INVASIÓN LINFOVENOSA	NO SÍ	3 (37,5%) 5 (62,5%)	2 (25%) 6 (75%)	N.S
INVASIÓN PERINEURAL	NO SÍ	4 (50%) 4 (50%)	4 (50%) 4 (50%)	N.S
PROGRESIÓN (AP y/o exitus tumoral)	NO SÍ	7 (87,5%) 1 (12,5%)	2 (25%) 6 (75%)	P=0,041
EXITUS (por cualquier causa)	NO SÍ	8 (100%) 0 (0%)	6 (75%) 2 (25%)	N.S
EXITUS (asociado al tumor)	NO SÍ	8 (100%) 0 (0%)	6 (75%) 2 (25%)	N.S

Tabla 32: relación entre la presencia o ausencia de KRAS mutado plasmático postoperatorio y las variables clínicopatológicas.

No se han podido calcular las posibles relaciones de detección de KRAS plasmático mutado postquirúrgico con el tiempo de supervivencia global y cáncer específicas porque

en el momento de la finalización del estudio no había pacientes con ADN plasmático tumoral negativo que hubieran fallecido.

4.7.5.- Variaciones en la detección de ADN tumoral después de la cirugía

Se evaluaron los cambios acontecidos en el ADN plasmático mutado tras la cirugía, cuyos cambios se detallan en la tabla 33.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	PERMANECEN NEGATIVOS	4	5,6	25,0	25,0
	PERMANECEN POSITIVOS	4	5,6	25,0	50,0
	SE NEGATIVIZAN	4	5,6	25,0	75,0
	SE POSITIVIZAN	4	5,6	25,0	100,0
	Total	16	22,5	100,0	
Perdido	Sistema	55	77,5		
Total		71	100,0		

Tabla 33: variaciones en la detección de ADN tumoral tras la cirugía.

Se elaboraron tablas de contingencia para estudiar las posibles relaciones entre dichas variaciones y variables clínicopatológicas como el estadio pT, estadio M, presencia de carcinomatosis y la existencia de metástasis. Los datos más relevantes tras cada una de ellas fueron:

- ❖ Todos los pacientes con estadíos inferiores a T2 se negativizaron tras la cirugía frente a un 14,3% de los pacientes T3 o T4 (no significativo).
- ❖ El 50% de los pacientes con **metástasis** al diagnóstico tuvieron ADN tumoral antes y después de la cirugía, y se positivizaron un 25% de los enfermos con metástasis al diagnóstico. Por el contrario, el 75% de los enfermos sin metástasis no presentaron ADN tumoral tras la cirugía (un 37,5% tampoco lo tenían antes y otro 37,5% se negativizaron tras la intervención) (**SIGNIFICATIVO p= 0,05**) (Tabla 34).

- ❖ Todos los pacientes con **carcinomatosis peritoneal** y ADN tumoral prequirúrgico permanecieron con ADN tumoral tras la intervención, frente a un 20% de enfermos sin carcinomatosis peritoneal. El 53,5% de los enfermos sin carcinomatosis peritoneal no presentaron ADN mutado tras la intervención (el 26,7% tampoco lo tenían previamente y otro 26,7% se negativizó) (p=no significativo).
- ❖ Un 77,7% de los enfermos que no desarrollaron metástasis o **progresión** en el seguimiento no tenían ADN tumoral tras la cirugía (un 33,3% tampoco lo tenían antes de la cirugía y un 44,4% se negativizó). Por el contrario, un 85,7% de los enfermos con ADN tumoral tras la cirugía desarrollaron metástasis (un 57,1% ya tenían ADN tumoral antes de la intervención y un 28,6% se positivizó) (**SIGNIFICATIVO p= 0,031**) (Tabla 35).

			Estadio M		Total
			No	Si	
CAMBIOS EN ADN MUTADO TRAS LA CIRUGÍA	PERMANECEN	Recuento	3	1	4
	NEGATIVOS	% dentro de Estadio M	37,5%	12,5%	25,0%
	PERMANECEN	Recuento	0	4	4
	POSITIVOS	% dentro de Estadio M	,0%	50,0%	25,0%
	SE NEGATIVIZAN	Recuento	3	1	4
		% dentro de Estadio M	37,5%	12,5%	25,0%
	SE POSITIVIZAN	Recuento	2	2	4
		% dentro de Estadio M	25,0%	25,0%	25,0%
Total		Recuento	8	8	16
		% dentro de Estadio M	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 34: relación entre las variaciones en la detección de ADN tumoral tras la cirugía y el estadio M.

			Aparición de metástasis		Total
			NO	SI	
CAMBIOS EN ADN MUTADO TRAS LA CIRUGÍA	PERMANECEN NEGATIVOS	Recuento % dentro de Aparición de metástasis	3 33,3%	1 14,3%	4 25,0%
	PERMANECEN POSITIVOS	Recuento % dentro de Aparición de metástasis	0 ,0%	4 57,1%	4 25,0%
	SE NEGATIVIZAN	Recuento % dentro de Aparición de metástasis	4 44,4%	0 ,0%	4 25,0%
	SE POSITIVIZAN	Recuento % dentro de Aparición de metástasis	2 22,2%	2 28,6%	4 25,0%
Total		Recuento % dentro de Aparición de metástasis	9 100,0%	7 100,0%	16 100,0%

Tabla 35: relación entre las variaciones en la detección de ADN tumoral tras la cirugía y la progresión de la enfermedad tumoral.

5.- DISCUSIÓN

5.1.- COMENTARIOS AL MÉTODO

5.1.1.-Elección de ADN circulante como biomarcador en cáncer

Se han hallado diversas formas de CNAPS que han sido detectadas y utilizadas como fuente de biomarcadores tanto en el estudio del cáncer como en distintos tipos de enfermedades, entre las que se incluyen las diversas formas de ADN, como el ADN genómico, ADN mitocondrial y ADN viral, pero también varios tipos de moléculas de ARN y micro ARN (44, 51, 62).

De forma muy similar a lo acontecido con el descubrimiento las moléculas de ADN circulante, la existencia de ARN en sangre era conocida desde muchos años atrás (176), hecho que adquirió una notable importancia con el hallazgo años más tarde de ARN mensajeros (ARNm) específicos de diversos tumores, lo que contribuyó a abrir nuevas vías de investigación de biomarcadores en el cáncer (177, 178). Hoy en día, la presencia de ARN circulante en pacientes con cáncer, al igual que ocurre con el ADN circulante, se considera un fenómeno ubicuo (76) y se ha demostrado su relación en numerosos tipos de cáncer como colon (179-181), mama (182, 183), tiroides (184), próstata (185, 186), melanoma (178), pulmón (187), entre otros. A pesar de ello, tanto el origen como los mecanismos de liberación y función de dicho ARN circulante no son bien conocidos (45).

Por citar uno de los ARNm más estudiados en el CCR destacaremos el de la telomerasa transcryptasa inversa humana (hTERT), que corresponde a una ribonucleoproteína implicada en la reparación y alargamiento de los telómeros de las células eucariotas, con una actividad aumentada de forma característica en múltiples tumores (179, 181, 183, 185, 188-191). En particular, en el CCR (188), se ha observado una adecuada correlación de los niveles de hTERT plasmático en los diferentes estadios del CCR, por lo que se ha considerado como una herramienta de cribado, monitorización y respuesta al tratamiento (191).

Sin embargo, la utilización de ARN circulante como biomarcador respecto al ADN tiene como principal desventaja su **fragilidad molecular**, ya que estas moléculas son muy proclives a una degradación enzimática inmediata (192), lo que puede alterar las determinaciones analíticas, a pesar de que se ha observado que el ARN endógeno es más estable en plasma que el ARN purificado en el laboratorio (193). Se han advertido diversos factores preanalíticos y analíticos que pueden influir en sus determinaciones, tales como la fuente de detección, hemólisis, tiempo de procesamiento de las muestras, los anticoagulantes, la temperatura ambiental y de conservación, y principalmente los protocolos de centrifugación y filtración (194), que presentan un gran impacto tanto en las concentraciones finales de ARN como en su calidad (193). Por todo ello, para su estudio se requieren técnicas más complejas y elaboradas que introduzcan simultáneamente controles internos (195). Además, y al igual que ocurre con el ADN, el ARN circulante no es específico de pacientes con cáncer, y puede encontrarse en voluntarios sanos o en aquellos que sufren distintas enfermedades benignas o traumatismos (92, 196).

Sin entrar en detalles, menciono aparte podrían representar los microARN, que se han considerado probablemente uno de los mayores y más novedosos avances en el campo de los CNAPS como biomarcadores en los últimos años, pues componen moléculas más estables, por lo que son más fácilmente amplificables por PCR. Desde su descubrimiento en 1993, el número de microARN no ha dejado de incrementarse, y en la actualidad se han descrito más de 2500 microARN humanos en las bases de datos (miRBase). Los microARN son moléculas no codificantes de pequeño tamaño (18-22 nucleótidos), que regulan sus ARNm específicos y de esta forma modulan la actividad de sus genes diana (197) (198). Su expresión aberrante en los distintos tipos de cáncer sugiere que pueden funcionar como oncogenes y como genes supresores tumorales (199). A pesar de que se considera que contribuyen en todas las etapas del proceso de tumorigénesis, concretamente donde parece más estrecha su relación es en la regulación del desarrollo de las metástasis (198). Se han relacionado con múltiples tipos de cáncer como el CCR (200-203), pero también otros como pulmón (204-206) (207), mama (208), próstata (209), gástrico (210), esofágico (211), y linfoma (212), entre otros.

Sin embargo, muchos aspectos del origen y liberación de los miRNA no son bien conocidos y a pesar de sus prometedores inicios, se han descrito algunos problemas ligados a su estudio. Concretamente en el CCR se han descrito más de 500 microARN relacionados directa o indirectamente únicamente con esta patología, y por tanto, su elevado número limita su especificidad (198). Además, su papel a día de hoy en desarrollo tumoral está por determinar con exactitud, así como el entendimiento de la regulación de las redes de microARN y cómo las familias de estos microARN se relacionan entre sí (198).

En los últimos años también ha cobrado importancia el descubrimiento de fragmentos largos (más de 200 pares de bases) no codificantes de ARN (RNA long non-coding) como nuevos biomarcadores en el cáncer. Se ha descubierto que tienen actividad biológica por sí mismos, y a diferencia de los ARNm no dependen de la traducción a proteínas efectoras, por lo que sus niveles se correlacionan más directamente y con mayor precisión con los fenotipos del cáncer, sin embargo, su estudio está todavía en una fase muy precoz (213).

En definitiva, a pesar de los recientes avances en la investigación de las moléculas de ARN circulantes y en particular en los microARN todavía quedan muchos aspectos por descubrir. Por consiguiente, dadas las características de mayor estabilidad molecular del ADN, su mayor simplicidad en los métodos de aislamiento, detección y amplificación, así como la posibilidad de descubrir y detectar alteraciones moleculares específicas propias del tumor primario mediante algunas de las novedosas técnicas que atesoran gran sensibilidad y especificidad, han permitido que dichas moléculas de ADN tengan una mayor representación en la literatura mundial y sean las más usualmente utilizadas en las técnicas de laboratorio. De ahí esta elección en el diseño del presente estudio.

5.2.- ELECCIÓN DE *KRAS* COMO MARCADOR DE ADN TUMORAL

En la investigación oncológica, y con el descubrimiento del genoma humano, se han estudiado múltiples alteraciones genéticas ligadas al cáncer, y una de las más frecuentemente utilizadas es el oncogén *KRAS* en el cáncer en general y en el CCR en particular, pues posee una serie de características propias que lo hacen particularmente útil en este propósito. Se describió por primera vez ligado al estudio del cáncer de páncreas en 1994 (49), y desde entonces se han llevado a cabo numerosos estudios.

Entre las razones por las cuales *KRAS* es uno de los oncogenes más estudiados en patología tumoral, y fue también objeto del presente estudio, hemos de resaltar las siguientes (94, 214):

- Este gen se encuentra frecuentemente mutado en diversos tipos de tumores humanos como los CCR, adenoma de páncreas, pulmón y tiroides. También se encuentran mutaciones puntuales de *KRAS*, aunque menos frecuentemente, en tumores testiculares, carcinoma de vesícula biliar, estómago, endometrio y ovario, así como en ciertos tipos de neoplasias hematológicas.
- Las secuencias mutadas de *KRAS*, detectadas en sangre, parecen estar asociadas específicamente con la presencia de tumores.
- Las mutaciones de *KRAS* aparecen mayoritariamente en el codón 12 del exón 1, con lo que los métodos dirigidos a la detección de mutaciones en esta posición son relativamente sencillos.

Además, más selectivamente elegimos *KRAS* para el estudio mutacional del CCR por otras razones concretas (94):

- Existe una alta prevalencia (20-50% aproximadamente) de mutaciones del oncogén *KRAS* en el CCR.
- Dichas mutaciones ocurren de forma precoz en el proceso de tumorigénesis, de forma que se detectan incluso en fases de adenoma.
- Alrededor de un 80% de pacientes con CCR pueden presentar un estrecho espectro de mutaciones de *KRAS*, con cambios localizados principalmente en el

codón 12, o menos frecuentemente en el codón 13, o incluso más raramente en el codón 61.

- Se han desarrollado técnicas de PCR altamente específicas y sensibles para la detección de dichas mutaciones de *KRAS*, facilitadas por el conocimiento de los puntos de mutaciones principales.

5.3.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ADN CIRCULANTE

A la hora de trabajar con CNAPS existen numerosas consideraciones destacables durante el trabajo de laboratorio y a nivel preanalítico que pueden afectar las determinaciones obtenidas y han de ser tenidas en cuenta para la adecuada interpretación de los hallazgos.

En primer lugar no hay consenso en la literatura acerca de cuál es la mejor **fente de detección**, el suero o el plasma. Es perfectamente conocido que las concentraciones de ácidos nucleicos en suero son 3-24 veces mayores que en plasma, probablemente debido a la liberación de ADN por la lisis de los leucocitos durante el proceso de coagulación/fibrinólisis en el procesamiento de las muestras. Esto no se corresponde fielmente con las concentraciones plasmáticas de ADN tumoral de los pacientes (64, 215, 216), puesto que el ADN plasmático circulante se encuentra, al menos parcialmente, contaminado por ADN genómico liberado por dichos leucocitos, de modo que el ADN específico está diluido por altas concentraciones de ADN genómico no específico (217). Así, aunque algún autor ha reportado que las diferencias en las concentraciones plasmáticas de ácidos nucleicos podían ser debidas a la distribución desigual del ADN durante el proceso de separación de la sangre en lugar de a fenómenos de contaminación, advocating que el suero representa mejor fuente de detección que el plasma (218), para la mayoría de los grupos de investigación en el campo de la oncología el plasma es inequívocamente la fuente de elección de ADN específico tumoral por su mayor sensibilidad al realizar estudios comparativos (69, 215). Este es el motivo fundamental por el que nos decantamos por el plasma como fuente más fidedigna para las determinaciones en nuestro estudio.

Como hemos visto, un factor esencial para la utilización de ácidos nucleicos circulantes consiste en la eliminación de cualquier tipo de contaminación celular en las muestras plasmáticas, para lo que se recomienda el empleo de protocolos de **centrifugación** que combinen ciclos de baja y seguidamente alta intensidad respectivamente y/o **filtración** (69, 150, 217, 219-222) como los utilizados en nuestro trabajo, en el que combinamos ambos métodos para la obtención y purificación del ADN plasmático.

Además, como el ADN plasmático tumoral consiste en fragmentos de distinto tamaño, es destacable la utilización de métodos de **aislamiento** fiables que permitan detectar todas las fracciones de ADN, aspecto que tiene gran importancia en su confiabilidad y en todos los experimentos posteriores. De hecho, algunos estudios apuntan a que las menores tasas de detección de ADN tumoral podrían explicarse por la pérdida de fragmentos de pequeño tamaño (menores de 150 pares de bases) durante dicho proceso (64). Para el **aislamiento** del ADN existen múltiples técnicas de laboratorio disponibles, probablemente tan numerosas como el número de laboratorios que las utilizan. El principal problema cuando se trabaja con ácidos nucleicos extracelulares es, tanto la baja concentración obtenida, como su pobre calidad, con independencia del método utilizado (44) y puede ser un factor limitante en caso de querer realizar estudios de caracterización genética (44). De los múltiples métodos descritos en la literatura los métodos de aislamiento comerciales basados en columnas con **membranas de gel-sílice** parecen obtener una mayor eficiencia y reproducibilidad en la obtención de ADN purificado, por lo que es el método por el que nos decantamos al diseñar nuestro trabajo. A pesar de ello, no existe un método estandarizado de aislamiento de elección, y según algunos autores pueden existir grandes variaciones en las cuantificaciones según el método empleado cuando comparan distintos kits comerciales mediante PCR (223).

Hay también diferentes **factores pre-analíticos** que pueden interferir en la obtención de resultados, como el anticoagulante empleado, el retraso en el procesado de las muestras sanguíneas y la temperatura de conservación, que pueden alterar el rendimiento del ADN obtenido. Así, el uso de **anticoagulantes** permiten estabilizar las muestras cuando el procesamiento de la sangre se retrasa hasta 6 horas sin alterar las concentraciones del ADN, utilizando el EDTA de elección (224). Sin embargo, aunque

el EDTA es considerado un anticoagulante privilegiado se recomienda realizar las determinaciones de laboratorio dentro de las 6 primeras horas posteriores a la venopunción. En cuanto al tiempo de conservación algunos autores han comprobado que no hay cambios en la concentración de ADN plasmático en muestras almacenadas a 4°C o a temperatura ambiente durante 24 horas (219). Sin embargo, el almacenamiento de la sangre a temperatura ambiente antes de la centrifugación sí tuvo un impacto substancial en la concentración de ADN extraído de muestras de suero (219). Por estos motivos empleamos el EDTA como anticoagulante y seguimos escrupulosamente las recomendaciones de almacenamiento posterior de las muestras tras su extracción.

Finalmente el **retraso en el procesado de las muestras sanguíneas y la temperatura de conservación** parecen influir en la determinación del ADN obtenido, aunque hay muy pocos datos acerca del efecto que tienen las condiciones de almacenamiento en las concentraciones de ADN plasmático. Se ha observado que el almacenamiento prolongado de plasmas congelados a -80°C no presentan variación en las concentraciones medias de ADN tras los primeros 9 meses de conservación. Sin embargo, hay estudios que evidencian un leve descenso en las concentraciones con el almacenamiento prolongado. Por ello se recomienda alicuotar y almacenar a -80°C las muestras y evitar numerosos ciclos de congelación y descongelación (217). Por otra parte, el impacto del almacenamiento prolongado mediante congelación (225), y los repetidos ciclos de congelación y descongelación de las muestras plasmáticas, producen un descenso en la concentración y en la integridad de cadena por fragmentación molecular con un notable descenso en la concentración de ADN plasmático a partir del tercer ciclo de descongelación (226). Particularmente en nuestro estudio el tiempo medio de conservación de las muestras presentó necesariamente una media elevada de 9 meses, con un rango de hasta 23 meses, pero se preservó al máximo el exceso de manipulación y descongelación de las mismas para limitar el posible impacto en la concentración e integridad genómicas.

Como hemos visto, todas estas variantes metodológicas destacadas en este apartado acerca de la elección, conservación y preparación de las muestras para las mediciones cuantitativas y cualitativas subsiguientes del ADN plasmático son una parte esencial a tener en cuenta previamente al empleo de las distintas técnicas de laboratorio que pueden tener un impacto en los resultados e interpretación del trabajo subsiguiente.

5.3.1.- Técnicas de laboratorio empleadas para la detección y cuantificación del ADN plasmático circulante

El avance en el estudio e investigación de los CNAPS en los últimos años se ha producido de la mano del desarrollo tecnológico. La llegada tanto de técnicas de secuenciación masiva en paralelo, como de técnicas digitales de PCR han propiciado la caracterización completa del genoma en distintos tipos de tumores (101) (Atlas del Genoma del Cáncer, 2012), desde la secuenciación completa (WGS: *Whole genome sequencing*), que conlleva una gran complejidad, pasando por métodos más selectivos como la secuenciación de exomas (WES: *whole exome sequencing*) o la secuenciación de fragmentos diana (TS: *targeted sequencing*). Esto ha permitido tanto la selección como la validación de las alteraciones genómicas en el tDNA, incluyendo variantes mutacionales poco frecuentes, así como la detección de mutaciones somáticas en genes controladores conocidos y que están limitadas a pacientes portadores de dichas mutaciones (102).

Hay disponibles una gran variedad de procedimientos que han demostrado su validez, tanto en sangre como en otros líquidos corporales y todos estos métodos de detección, caracterización y cuantificación de ácidos nucleicos plasmáticos presentan el reto de conseguir adecuadas tasas de sensibilidad y especificidad, fundamentalmente en el estudio del tDNA diluido en el fondo del ADN plasmático procedente de células normales (227). Entre estas técnicas se incluyen, además de las técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real, fluorimetría y espectrofotometría empleadas en nuestro estudio, diversas variantes técnicas de PCR “enriquecida”, como PCR-SSCP (del inglés *Polymerase Chain Reaction Single-Strand Conformation Polymorphism*, PCR-RFLP (del inglés *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), MASA (del inglés *Mutant Allele Specific Amplification*), ASA (del inglés *Allele Specific Amplification*), técnicas de detección inmunológica como el ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), (44, 221), BEAMing (33, 228), técnicas de electroforesis como el TGGE (del inglés *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), métodos de hibridación, entre otras (37, 44).

Para comprobar la importancia de la heterogeneidad metodológica en los métodos de laboratorio en la comparabilidad de resultados comentada en el apartado anterior, hemos querido desarrollar nuestro estudio utilizando tres técnicas de detección y cuantificación de ADN muy diferentes entre sí, tanto en la ejecución práctica como en los principios funcionales que las sustentan. Procederemos a revisar sus fundamentos y los motivos que nos llevaron a elegirlos.

✓ **Fluorimetría**

Los estudios elaborados mediante esta técnica permiten la cuantificación directa de las muestras de plasma, suero u otros líquidos corporales al diluirlas utilizando un colorante fluorescente en el aparato lector o fluorímetro. Estas determinaciones se han hecho muy populares en los trabajos científicos bajo diferentes formas y denominaciones como DNA DipStick, PicoGreen, SYBR Gold (Invitrogen, Paisley, UK) entre otros, pero bajo el mismo principio metodológico (229). En nuestro trabajo fue uno de los métodos elegidos, pues poseen la gran ventaja de que pueden prescindir de las complejas fases de procesamiento inicial o de amplificación previas, por lo que son considerados métodos simples, robustos, baratos, y menos demandantes técnicamente que otros métodos más sofisticados (64). Permiten la detección del ADN bicatenario circulante en concentraciones bajas, que oscilan en la literatura entre 1ng/ml y 25 pg/ml (230, 231), lo que aporta evidentes ventajas para un uso rutinario (219, 231, 232) (233, 234) (235). Se han elaborado estudios en los que se obtienen tasas de detección y valores más elevados de cuantificación al ser comparados con otras técnicas teóricamente más sensibles como la PCR cuantitativa (232). Estas discrepancias podrían explicarse en base a las características intrínsecas que albergan ambos métodos de cuantificación, pues mientras que los métodos fluorimétricos detectan la cantidad total de ADN circulante, la PCR cuantitativa mide la amplificación de una secuencia diana específica. Algunos trabajos han destacado que la precisión de los resultados de cuantificación por métodos fluorimétricos se ven claramente afectados por dos factores fundamentalmente: por una parte por el grado de fragmentación del ADN, lo que conlleva una disminución de su sensibilidad por esta técnica (230), al no detectarse adecuadamente fragmentos menores de 100 pares de bases (231). Por otra parte se trata de un método muy sensible a la impurezas y la degradación del ADN, pero tiene la capacidad de distinguir el ADN intacto de los productos degradados, lo que en

ocasiones puede conferir una ventaja. Así, según algunos trabajos para las cuantificaciones de ADN purificado que se ha almacenado durante un largo período de tiempo el método fluorimétrico debe considerarse siempre que sea posible (236), aspecto perfectamente aplicable a nuestro estudio por el prolongado tiempo de conservación de algunas muestras. En nuestro trabajo pudimos confirmar que es una técnica rápida, sencilla, reproducible, que permite analizar varias muestras en cada determinación.

✓ **Espectrofotometría**

Es una técnica de cuantificación de ácidos nucleicos ampliamente utilizada en el laboratorio por su seguridad, sensibilidad, inmediatez, bajo coste y sencillez de uso (44, 237), aspectos básicos que nos inclinaron a incorporar esta técnica en nuestro estudio. Se basa en la medición mediante un espectrofotómetro de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite una determinada muestra a una determinada longitud de onda de 260 nm, y permite de forma rápida, en un sólo paso y sin la necesidad de manipulación adicional la obtención de determinaciones cuantitativas y medición de la pureza de las muestras (230). Además, en el estudio comparativo es la técnica menos afectada por la fragmentación de los ácidos nucleicos con respecto a la fluorimetría y PCR (230).

Sin embargo, a pesar de detentar indudables ventajas esta técnica también ofrece algunas desventajas notables, entre las que podemos incluir una menor sensibilidad con respecto a las otras tres técnicas empleadas (219), con tasas de detección no inferiores a 1 ng/μl, (230, 232); que las mediciones no discriminan entre ADN y ARN, de modo que sus resultados están sesgados por la presencia de ADN de una sola hebra, oligonucleótidos y nucleótidos libres; y que también presenta una elevada susceptibilidad de la prueba a todo tipo de impurezas, al igual que la fluorimetría (236). Estos factores pueden limitar su uso en determinadas circunstancias deben ser tenidos en cuenta en su empleo. En nuestro estudio fuimos extremadamente precavidos con la manipulación de las muestras y la calibración del aparato lector, así como la realización de “blanco” previo a la cuantificación de cada una de las muestras plasmáticas de ADN para evitar contaminaciones y errores.

✓ Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Es una técnica de laboratorio muy versátil extensamente utilizada en diversos campos de la biología. Tiene la gran ventaja de que potencialmente cualquier fragmento de ADN puede ser amplificado si se conocen los cebadores o *primers* para el inicio de la misma (238). También es el método preferido para la detección y cuantificación de ARN, y cuando se combina con la enzima retrotranscriptasa (RT) se conoce como RT-PCR para la detección de los productos de transcripción génica (238-240). Constituye probablemente la herramienta más poderosa para el análisis de ácidos nucleicos en las comunidades científicas. Es una técnica de alta seguridad, reproducibilidad y eficacia (232, 241).

Los usos típicos de PCR en tiempo real incluyen el análisis de la expresión génica, análisis de polimorfismo de un solo nucleótido, el análisis de aberraciones cromosómicas, y más recientemente también la detección de proteínas en tiempo real por inmuno-PCR para los estudios de proteómica (238, 240).

Todas estas ventajas le confieren una gran aplicabilidad en campos de la biomédica, sin embargo en la actualidad el método de referencia para el diagnóstico molecular (241), y más concretamente en la investigación oncológica, la técnica de elección por la mayoría de los grupos. De esta forma se convierte en una buena opción tanto cuantitativa como cualitativa para el análisis de los ácidos nucleicos tanto por su elevada sensibilidad como especificidad, que le permiten detectar cantidades de entre uno y diez picogramos de ADN humano (230, 231).

Finalmente, y al igual que el resto de la técnicas también puede presentar algunas desventajas. En primer lugar es una técnica de elevado coste, en parte por el precio de las sondas fluorescentes que se utilizan (242), como también porque requiere de complejos sistemas tecnológicos automatizados para su detección (232). Por otra parte, en ocasiones su gran virtud puede convertirse en defecto, pues al tener gran sensibilidad pueden alterarse los resultados por contaminación de las muestras, que producirían una amplificación de secuencias genéticas que no se correspondan con la muestra analizada, por lo que es preciso poner controles internos para su detección. Al igual que para las otras técnicas también se han detectado posibles alteraciones de sus resultados por la

fragmentación de los ácidos nucleicos en las fases de procesamiento o almacenamiento (230), para lo que se han desarrollado novedosos métodos de detección de secuencias cortas de ADN denominados amplicones que minimizan este efecto (243).

En virtud de su irrevocable sensibilidad y especificidad fue la técnica de referencia frente a la que comparamos el resto de los métodos. Es el procedimiento más complejo de ejecutar, pues es muy sensible a posibles contaminaciones. A pesar de extremar las precauciones en la manipulación y preparación de reactivos y muestras precisó la repetición de la técnica cuando se mostraron alteraciones en los controles internos de la prueba.

Todas estas variantes metodológicas destacadas en este apartado acerca de la elección, conservación, preparación de las muestras, introducción de nuevas técnicas de laboratorio, y caracterización de las condiciones de estudio para las mediciones cuantitativas y cualitativas de los cambios del ADN plasmático son en parte fuente de la gran discrepancia de hallazgos y resultados divergentes presentes en la literatura. Por estos motivos, en distintas publicaciones se hace inciso en la necesidad de armonizar la metodología mediante la adhesión rigurosa a diversas guías de recomendación con el fin de estandarizar los procedimientos metodológicos y homogeneizar los resultados que permitan la obtención de resultados comparables (44, 114, 217, 244-246). Este hecho es esperable que comporte una mejor traslación clínica de estos hallazgos de investigación, que tienen por objetivo el desarrollo e implantación de test sanguíneos simples y reproducibles para su empleo como herramientas de laboratorio rutinarias en el cuidado del paciente, lo que permitiría ejercer como auténticas “biopsias líquidas”, que de forma no invasiva contribuyan a la toma de decisiones clínicas en la monitorización de la enfermedad, asesoramiento de enfermedad residual y en la respuesta al tratamiento.

En el presente estudio aplicamos una técnica basada en el uso de sonda PNA para la detección de ADN mutado. Con ella pudimos detectar una tasa del 50% de pacientes con KRAS mutado en la pieza tumoral, lo cual es una tasa relativamente baja pero mayor que lo reportado previamente con otras técnicas (166) y en consonancia con algunos trabajos publicados previamente (94).

5.3.2.- Correlación entre los métodos de cuantificación de ADN plasmático

En un primer lugar se evaluó la posible correlación entre distintos métodos de cuantificación de ADN plasmático en el perioperatorio. Por una parte empleamos la PCR-Q, que usamos como método “estándar” por su conocida sensibilidad y especificidad (171). Por otra parte, evaluamos otras técnicas como la fluorimetría y espectrofotometría, que también han sido utilizadas y se encuentran descritas en diversos estudios de cuantificación (127, 237, 247, 248). En base a nuestros hallazgos pudimos objetivar que arrojan resultados muy dispares, y que al realizar la comparativa entre las tres técnicas **no pudo establecerse una adecuada correlación entre la PCR-Q y la fluorimetría y espectrofotometría por un lado, ni entre fluorimetría y espectrofotometría por otro en el preoperatorio ni tampoco en el postoperatorio, salvo únicamente una débil correlación entre los niveles de ADN postcirugía obtenidos por PCR con los niveles de ADN postcirugía obtenidos por espectrofotometría.**

Es posible que dichas variaciones tengan que ver con los diferentes principios de medida que usan las técnicas utilizadas en la cuantificación. Así, mediante PCR medimos únicamente la amplificación de una secuencia diana, por espectrofotometría medimos la cantidad total de ADN tras realizar la extracción del mismo de la muestra sanguínea, mientras que por fluorimetría medimos ADN total sin necesidad de extracción alguna del material genético de la muestra. Con ello podríamos medir en todos cantidades y concentraciones de ADN, pero con diferentes herramientas de medida, que arrojan resultados dispares y no comparables entre sí.

En consecuencia, podemos observar como uno de los aspectos limitantes en la valoración del potencial clínico de los CNAPS es la gran variabilidad en los métodos de medida utilizados en su detección y cuantificación, y con ello, la dificultad que entraña la comparabilidad entre los datos obtenidos (44, 64, 114). Estos hallazgos nuevamente profundizan en un problema habitual en el estudio de los CNAPS, que consiste en la falta de armonización en las técnicas de laboratorio, lo que hace difícil la comparación de hallazgos y su posible traslación clínica. Con ello se pone de manifiesto la necesidad de establecer valores de referencia bajo la estandarización en los métodos y técnicas de

determinación que eviten la dispersión de resultados y permitan una adecuada interpretación de los mismos (44, 45, 64, 90, 249).

5.4.-VALOR CLÍNICO DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES *KRAS* EN TEJIDO TUMORAL

En el CCR, ha cobrado una notable relevancia la determinación de la mutación del oncogen *KRAS* en el estudio de la pieza tumoral (261), ya que aparte de su mencionada importancia biológica en el desarrollo oncogénico (250), constituye el evento genético más comúnmente observado, con un rango de determinación variable en la literatura que oscila entre el 20-50% según las publicaciones y bases de datos (94, 250-254).

Por ello, la primera parte de nuestro estudio se fundamentó en la **detección y análisis específico del oncogén *KRAS* en tejido tumoral** mediante la amplificación de sus secuencias específicas por PCR. Con ello, debemos reflejar que fuimos capaces de detectar dicha mutación únicamente **en el 24%** de los pacientes estudiados, lo que refleja una sensibilidad relativamente baja, pero en concordancia con algunos trabajos publicados (255). Cabe destacar que nuestro método de detección ya había sido validado en estudios previos de nuestro propio grupo de trabajo (37). Además pudimos comprobar extrínsecamente nuestra sensibilidad al cotejar nuestros hallazgos con los obtenidos en un centro externo en pacientes con estadio IV de la enfermedad a los que el Servicio de Oncología del CHUA había solicitado el estudio mutacional del gen *KRAS* previo a recibir tratamiento quimioterápico, y mostraron concordancia con nuestras determinaciones. Otro aspecto que podría incidir en la menor frecuencia de detección mutacional es la falta de determinación de otras mutaciones del gen *KRAS* menos frecuentes ubicadas en codones 13, 61 y 146 (256).

Una vez detectada la mutación sobre el espécimen tumoral, observamos que el genotipo más frecuente fue la mutación Gly12Asp (GAT), que supuso el 71% del total de los estudiados, en consonancia con la bibliografía que reporta una mayor frecuencia en dicha ubicación (255, 257, 258). Tras identificar las mutaciones específicas

valoramos en primer lugar su grado de correlación con diversas **variables clínicopatológicas**, sin poder establecer relación con ninguna de las variables mencionadas, a excepción de la presencia de **metástasis al diagnóstico**, más frecuentes en pacientes con mutación del gen *KRAS* (47,1%) respecto a los pacientes con el gen *KRAS* nativo (11,1%). Algunos trabajos publicados han obtenido resultados similares al nuestro (259). Otros autores han encontrado una relación entre la existencia de mutaciones en el gen *KRAS* con variables como la menor edad de presentación (258, 260), menor grado de diferenciación tumoral (252), la localización predominante proximal (253, 260, 261) o distal (258, 262), y específicamente las mutaciones del codón 12 con la presencia de adenopatías y estadios tumorales avanzados III-IV (172, 258, 261, 263), entre otras muchas revisadas, con resultados muy dispares (250, 263).

En resumen, si consideramos nuestros hallazgos y los comparamos con la gran heterogeneidad de estudios realizados y la diversidad de resultados que ofrecen, podemos observar la **dificultad para extraer conclusiones contrastadas que permitan inferir un valor clínico de la posible relación entre la detección de mutaciones del oncogen *KRAS* en tumores con variables clínicopatológicas específicas.**

Posteriormente, en la segunda fase de nuestro estudio profundizamos en el posible **valor pronóstico** de dichas mutaciones sobre el tejido tumoral con el análisis de las **curvas de supervivencia**. Se observó un **descenso en el tiempo de progresión de la enfermedad**, hecho que tuvo significación estadística. Sin embargo, **no pudo asociarse con la OS ni de supervivencia cáncer específica**. Así, el papel que juegan las mutaciones del gen *KRAS* en el CCR como factor pronóstico todavía es controvertido, con una gran riqueza bibliográfica al respecto de la que parecen desprenderse dos escenarios clínicos muy evidentes. Por una parte tumores en fase de evolución local donde la enfermedad se encuentra confinada al colon, es decir, hasta el estadio III de la clasificación TNM, donde todavía hoy su papel es muy discutible. Por otra los pacientes con enfermedad metastásica y/o diseminada en estadio IV de la enfermedad en los que hay evidencia clínica.

Los pacientes que presentan enfermedad local, a pesar de que la mayoría de los autores defienden el valor pronóstico de la detección de la mutación del gen *KRAS* en el

tejido tumoral con menores tasas de OS y DFS (172, 253, 264, 265), otros autores han cuestionado este hallazgo (250, 266). Así, en pacientes con estadios II-III que fueron sometidos a quimioterapia adyuvante no se ha demostrado valor pronóstico, tal y como se desprende del estudio realizado sobre un total de 1.564 muestras obtenidas de 3.278 pacientes reclutados en varios ensayos clínicos (PETACC-3, EORTC 40993 y SAKK 60-00) (266), ratificado posteriormente en un metanálisis (251). Otros metanálisis elaborados sin el efecto protector de la quimioterapia adyuvante concluyeron igualmente que no hay evidencias que permitan apoyar la asociación de mutaciones en el gen *KRAS* con la OS (267) ni con el pronóstico de la enfermedad cancerosa (251). En consecuencia en estadios iniciales de la enfermedad, con independencia de la asociación a la quimioterapia adyuvante, no está aceptado el valor pronóstico de la determinación de la mutación del oncogen *KRAS* en tejido tumoral.

Por contra los pacientes en estadio IV, su pronóstico se encuentra relacionado indefectiblemente con la resistencia de los tumores portadores de mutaciones en el gen *KRAS* al tratamiento adyuvante con anticuerpos monoclonales (30, 268, 269). Por ello, las guías clínicas de la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO) recomiendan analizar el estado mutacional *KRAS* en pacientes con CCR metastásico en el momento del diagnóstico de la enfermedad que sean candidatos a recibir tratamiento con anti-EGFR, ya que es un factor altamente predictivo negativo y pronóstico de la respuesta al tratamiento. Su importancia es tal que tanto la agencia federal americana (FDA) como la agencia europea de medicamentos (EMA) restringen la administración de anticuerpos monoclonales contra el receptor EGFR en los esquemas de quimioterapia en los pacientes con *KRAS* mutado (253, 259, 270, 271). Con independencia de la respuesta a la quimioterapia respecto al pronóstico cabría destacar un estudio sobre 331 pacientes con MHCCR sometidos a resección hepática portadores de mutaciones en los codones 12 y 13. Objetivaron que ciertas mutaciones específicas del codón 12 fueron factor pronóstico independiente de OS, y además aquellos pacientes que recurrieron de la enfermedad y presentaban las mutaciones tuvieron peor OS (272). De hecho, algunos trabajos han esgrimido también posibles diferencias en el pronóstico según la determinación genotípica tumoral en los codones 12 y 13 y que podrían dar lugar a diferentes consecuencias biológicas, bioquímicas y funcionales (273). Sin embargo, este fenómeno ha sido revisado en fechas recientes sin encontrar diferencias en cuanto a la supervivencia global (274).

El pequeño tamaño muestral de nuestro estudio no permitió hacer un estudio pronóstico estratificando entre estadios iniciales y estadios metastásicos en relación con la mutación de *KRAS*, de modo que se tomaron todos los tumores para elaborar las curvas de supervivencia. Probablemente por ello, en el conjunto de nuestro estudio no pudimos obtener relación con la *OS* ni con la supervivencia cáncer específica, pues como podemos observar su valor pronóstico queda ligado en la literatura a estos dos aspectos fundamentales: estadificación y mutación del gen *KRAS* para predecir respuesta a la quimioterapia adyuvante.

En conclusión, las determinaciones de las mutaciones del gen *KRAS* en tejido tumoral se harán cada vez más frecuentes ya que un elevado porcentaje de entre el 20-50% de pacientes con estadios II y III van a progresar a lo largo de la evolución de su enfermedad a estadio IV (268), por lo que es muy probable que la extensión del estudio molecular de *KRAS* tenga que realizarse ya desde el momento del diagnóstico en todos los pacientes, independientemente del estadio y no solamente en pacientes en estadio IV o refractarios al tratamiento convencional (265), y de una forma estandarizada (268).

5.5.- VALOR CLÍNICO DEL ADN PLASMÁTICO TOTAL

El valor clínico del ADN plasmático se ha visto en ocasiones cuestionado por aspectos como el solapamiento de las concentraciones presentes en pacientes aquejados por enfermedades sistémicas benignas o situaciones de estrés fisiológico (44, 62, 93, 275, 276). Además, con el posterior descubrimiento de mutaciones específicas tumorales circulantes podría especularse que su papel podría quedar relegado.

Por ello, para justificar la pertinencia en el estudio de la cuantificación del ADN plasmático sobre el ADN plasmático tumoral es preciso realizar algunas consideraciones. Se sabe que la contribución del ADN tumoral al total de ADN circulante es muy relativa, y depende de factores tan diversos como la carga tumoral, el grado de agresividad del fenotipo mostrado por el tumor y la respuesta sistémica del huésped, entre otros (98). Así, se ha observado que en pacientes con baja carga tumoral

la mayoría del ADN plasmático en sangre periférica procede de células no transformadas, en lugar de células tumorales (98). Este fenómeno, estudiado en humanos y modelos animales apoya la idea de la existencia de una interacción activa entre las células tumorales y las células no tumorales del huésped, las cuales incitan la liberación de ADN durante todas las fases de la tumorigénesis mediante un mecanismo de respuesta inflamatoria sistémica (44, 52). Por consiguiente, podemos inferir como una ventaja el empleo del ADN plasmático en sangre como fuente de determinación, que podría ser más representativo del conjunto de la enfermedad al contener potencialmente ambas características adversas en el individuo, la específica tumoral y la del huésped, lo que sin entrar en la compleja heterogeneidad intratumoral le otorgaría un dibujo más detallado de la compleja biología tumoral (169).

Además, otro aspecto destacable a favor de la cuantificación del ADN plasmático como herramienta de determinación clínica es que parece técnicamente más asequible que la detección del ADN plasmático tumoral, que requiere de técnicas más selectivas de diagnóstico. Además, actualmente no todos los carcinomas están asociados a alteraciones específicas conocidas del ADN, y por tanto su baja sensibilidad como la complejidad en los métodos para su detección los hacen menos atractivos para su práctica clínica (86). Para salvar las limitaciones en la sensibilidad y especificidad que se derivan de los métodos de cuantificación del ADN plasmático, y con ello incrementar su valor diagnóstico y pronóstico, algunos autores propugnan su utilización junto con la determinación de otras alteraciones genéticas tales como las hipermetilaciones de genes promotores como el p16 (127), la integridad de cadena (85, 86), o en combinación con marcadores séricos habituales como el CEA (233).

Tomando como fuente de determinación el ADN plasmático y en base a estas cuestiones en nuestro estudio tratamos de valorar varios aspectos. Por una parte desde un punto de vista metodológico evaluar y comparar diferentes técnicas de cuantificación. Por otro lado, desde el punto de vista clínico determinar su posible valor predictivo pronóstico y en la estadificación tumoral en el CCR.

5.5.1.- Valor clínico de la cuatificación de ADN plasmático en la estadificación tumoral

Para su mejor comprensión dividiremos el estudio clínico de la estadificación en 2 partes: análisis de los datos preoperatorios y postoperatorios inicialmente, y después el análisis en el perioperatorio para evaluar los posibles cambios que la cirugía aportaría a las determinaciones de ADN plasmático.

En primer lugar, en nuestro estudio se valoró separadamente la posible asociación entre las variaciones de cuantificación de ADN plasmático preoperatorio y postoperatorio y diversas variables clínicopatológicas relacionadas con el tumor, estadio, extensión de la enfermedad, invasividad tumoral, progresión y exitus analizadas como variables independientes. En lo que sabemos a este respecto hay trabajos que han indagado en este potencial valor clínico diagnóstico y de estadificación. Aunque se ha postulado que una vez establecidos determinados valores de referencia la cuantificación de ADN plasmático podría tener valor discriminativo en la detección de pacientes con cáncer (90), e incluso se ha estudiado su uso en programas de cribado para diagnóstico precoz (85, 86, 173, 234, 277), su papel hoy en día sigue siendo controvertido por la falta de valores de referencia (229, 278). En cuanto a la estadificación tumoral se han realizado múltiples estudios sobre el cáncer en general y el CCR en particular. Por citar algunos ejemplos concretos, se examinaron estas relaciones mediante PCR en pacientes con CCR intervenidos, con determinaciones plasmáticas seriadas antes y cada 3 meses tras la cirugía, y se reflejó una asociación con el estadio tumoral, aunque sólo obtuvo significación estadística la variable pT (161). También se observó relación cuantitativa de ADN plasmático con la presencia de metástasis de CCR en un estudio por espectrofotometría (253). En esta línea sobre otros tipos de tumores se han encontrado relaciones con la estadificación tumoral mediante PCR en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (168), o carcinoma gástrico (278); o con el tamaño tumoral, adenopatías y TNM en tumores de mama por fluorimetría (105).

Sin embargo en nuestro estudio las técnicas de PCR y fluorimetría no mostraron hallazgos significativos con la estadificación tumoral y únicamente **los valores de espectrofotometría obtuvieron resultados con significación estadística. En el preoperatorio se observó que los pacientes que presentaron mutaciones del gen**

KRAS tenían valores más elevados de ADN plasmático. Curiosamente también en el postoperatorio los pacientes que murieron tanto por causa tumoral, como por causa no tumoral presentaron valores significativamente menores de ADN plasmático medidos por espectrofotometría, lo que difiere con los resultados obtenidos en la literatura y ponen en duda su valor clínico.

Cuando por otra parte realizamos el estudio con los datos de cuantificación perioperatorios mostraron únicamente significación estadística los **niveles de ADN plasmático medidos por fluorimetría, que fueron significativamente más altos después de la cirugía. También los niveles obtenidos por PCR y espectrofotometría resultaron más elevados en el postoperatorio, pero sin alcanzar significación.**

En este apartado no obtuvimos significación estadística con ninguna de las variables clínicas estudiadas anteriormente mencionadas por cualquiera de los métodos de laboratorio, lo que también cuestiona el valor de la cuantificación del ADN plasmático en la estadificación tumoral perioperatoria. No obstante, hay artículos y trabajos de revisión que coinciden básicamente con nuestros resultados, y sostienen una falta de correlación entre la concentración de ADN plasmático y variables como el tamaño, estadio y localización tumoral (44, 64, 94).

Para tratar de explicar esta falta de correlación entre los niveles de ADN plasmático y el estadio tumoral se han elaborado estudios en modelos animales que indagan en la comprensión de la biocinética del ADN plasmático, y se han detectado elevadas concentraciones incluso desde fases precoces de la enfermedad, sin relación con el tamaño tumoral ni la presencia de metástasis, lo que cuestionaría su potencial diagnóstico en dicha estadificación (52).

En conclusión podemos afirmar que la cuantificación del ADN plasmático en el perioperatorio difiere significativamente según la técnica de determinación empleada, y dicha cuantificación perioperatoria no muestra claramente relación con las variables clínicas de estadificación tumoral.

5.4.2.- Valor en el pronóstico de la enfermedad

Para finalizar este apartado realizaremos el análisis pronóstico en 2 apartados con el estudio de las curvas de supervivencia y los modelos multivariantes de regresión, de forma similar al proceder previo. Comenzaremos con el análisis de los datos de ADN plasmático preoperatorios y postoperatorios, y terminaremos con el estudio perioperatorio para estimar los posibles cambios que provoca la cirugía.

Aunque como se ha comentado previamente la validez de la cuantificación del ADN plasmático en el diagnóstico y la estadificación tumoral parece ser limitada, son muy numerosos los trabajos publicados en la literatura que suscriben un valor pronóstico de dichas cuantificaciones para la determinación *DFS* y *OS* (64, 127, 168, 170). Además, en una revisión reciente se ha observado que la magnitud del efecto del ADN plasmático tumoral fue similar a la del ADN plasmático total, cuestionando el valor añadido de la evaluación del ADN plasmático tumoral como factor pronóstico (98).

Respecto a su valor pronóstico, únicamente los **valores preoperatorios obtenidos por PCR mostraron correlación de forma inversa y débil entre el tiempo de *DFS* y los niveles de ADN plasmáticos. El resto de los métodos de laboratorio no obtuvieron relación significativa alguna.**

Con las **determinaciones postoperatorias se observó por PCR una correlación inversa y moderada con el *DFS* y con el *OS*. De forma similar la fluorimetría mostró correlación inversa y moderada con el *OS*. La espectrofotometría no mostró relación significativa pronóstica.**

Al analizar estos resultados obtenidos mediante las 3 técnicas de laboratorio pudimos nuevamente constatar la gran variabilidad existente entre los resultados. Cabe destacar que se confirma la PCR como única técnica con valor predictivo en las muestras pre y postoperatorias, con determinaciones en consonancia con los trabajos mencionados anteriormente (64, 127, 168-170). La espectrofotometría fue el único método que no mostró valor alguno en las cuantificaciones, y por último la fluorimetría, que para algunos autores representa una técnica con mayor sensibilidad y especificidad en el

estudio pronóstico del CCR que el CEA, únicamente mostró valor pronóstico en las determinaciones postoperatorias (127).

Tomados estos resultados con la prudencia necesaria, dado el escaso número de pacientes podemos establecer que nuestros hallazgos sugieren una **relación inversa entre valores absolutos de cuantificación de ADN plasmático y el DFS y OS**. En consonancia con nuestros hallazgos, algunos autores han observado que las elevadas concentraciones ADN plasmático constituyen un factor de riesgo independiente de peores resultados en términos de *DFS* y *OS* (64, 127, 168-171). En particular en el CCR se ha observado que la determinación preoperatoria de elevados niveles de ADN plasmático previo a la resección de metástasis hepáticas de CCR es un factor predictivo de recurrencia (69). Sin embargo, y al igual que ocurría en la utilización de estos valores de ADN plasmático para el diagnóstico y estadificación tumoral, la falta de valores de referencia que permita discriminar entre grupos de elevado riesgo se pone de manifiesto (44, 64).

Para terminar nuestro estudio realizamos un **análisis comparativo de las curvas de supervivencia en el perioperatorio** con los datos obtenidos de las 3 técnicas empleadas para estimar el posible el impacto de la cirugía en pronóstico. Los resultados obtenidos fueron:

- ❖ **Preoperatorio:** únicamente se obtuvo una débil correlación inversa entre los niveles preoperatorios de ADN plasmático obtenidos mediante PCR y el tiempo de progresión y OS, de modo que aquellos pacientes con mayores niveles preoperatorios de ADN plasmático tuvieron peor pronóstico de su enfermedad. Sin embargo, las determinaciones realizadas mediante espectrofotometría y fluorimetría no lograron detectar correlación alguna.
- ❖ **Postoperatorio:** de forma similar a lo acontecido en el preoperatorio las determinaciones mediante PCR establecieron una relación inversa con el tiempo de progresión y el OS, de modo que aquellos pacientes en los que tras la cirugía los niveles de ADN plasmático permanecieron altos tuvieron peor pronóstico. La

fluorimetría fue capaz también de mostrar relación inversa con el OS, mientras que la espectrofotometría no mostró relación alguna.

En concordancia, donde reside un mayor consenso bibliográfico es en la utilización del ADN plasmático para monitorizar la dinámica de respuesta de aquellos pacientes afectados de cáncer que son sometidos a tratamientos quirúrgicos (96, 172) y/o quimio-radioterápicos (85, 86, 97, 127, 168, 169, 173-175). En general, la rápida respuesta al tratamiento tiene valor pronóstico y se indica con un descenso de los valores tras el comienzo de la terapia, mientras que un mantenimiento o incremento durante el tratamiento refleja recurrencia (127), progresión tumoral o falta de respuesta al tratamiento (44, 85, 86, 96, 168, 173). Potencialmente en el perioperatorio inmediato podría demostrar la posible diseminación tumoral en el momento de la cirugía colorrectal y estimar la completa resección quirúrgica (161, 172, 278, 279).

Sin embargo en nuestro trabajo, al analizar las curvas de supervivencia en el perioperatorio mediante las 3 técnicas de laboratorio pudimos nuevamente constatar la gran variabilidad existente entre los resultados. Cabe destacar que se confirma la PCR como única técnica con valor predictivo en las muestras pre y postoperatorias, con determinaciones en consonancia con los trabajos mencionados anteriormente (64, 127, 168-170). La espectrofotometría fue el único método que no mostró valor alguno en las cuantificaciones perioperatorias, y por último la fluorimetría, que para algunos autores representa una técnica con mayor sensibilidad y especificidad en el estudio pronóstico del CCR que el CEA, únicamente mostró valor pronóstico en las determinaciones postoperatorias (127).

Con respecto a los los niveles de ADN plasmático **en nuestro estudio preoperatorio no mostraron resultados claramente concluyentes, lo que podría demostrar su limitado valor pronóstico. Sin embargo, en el postoperatorio sí parecen relacionarse con el DFS y OS por PCR y fluorimetría**, lo que demuestra su valor pronóstico en respuesta al tratamiento quirúrgico. Por consiguiente, la evolución dinámica del ADN plasmático en el perioperatorio inmediato para el pronóstico y la monitorización de la enfermedad podría tener un papel destacable tras el tratamiento quirúrgico.

Para finalizar este apartado, se realizó el **análisis multivariante** de regresión logística que permite identificar las variables de riesgo y cómo se relacionan en el perioperatorio. Se observó que en el preoperatorio, únicamente la existencia de metástasis multiplicaba el riesgo de progresión de la enfermedad. En el análisis multivariante de Cox utilizando como variables el tiempo de progresión y el tiempo total de supervivencia se observó que la existencia de metástasis, localización distal y particularmente la existencia de carcinomatosis reducían considerablemente el tiempo de DFS y de OS. Con el análisis multivariante de regresión logística y de Cox en el postoperatorio básicamente se observó que la presencia de metástasis, carcinomatosis, otras neoplasias y principalmente adenopatías afectas en la pieza de resección quirúrgica confieren un peor pronóstico en cuanto al tiempo de progresión y al tiempo total de supervivencia. La quimioterapia tuvo un efecto protector en el pronóstico.

En conjunto, en los modelos de regresión las variables que se asociaron a un peor pronóstico en términos de *DFS* o *OS* fueron la existencia de adenopatías en la pieza quirúrgica, metástasis y/o carcinomatosis al diagnóstico, presencia de otras neoplasias y localización distal del tumor, y por tanto puede observarse que **la cuantificación plasmática de ADN total en el perioperatorio inmediato no modifica sustancialmente los factores de riesgo que afectan al pronóstico del CCR tras la exéresis de la pieza quirúrgica.**

Como dato importante cabe también destacar el valor del efecto protector del tratamiento quimioterápico adyuvante que obtuvimos con respecto al *OS*, en consonancia con multitud de trabajos publicados (168, 169, 234, 277).

5.6.- VALOR CLÍNICO DEL ADN PLASMÁTICO MUTADO

En el empleo de los CNPAS como biomarcadores, la detección de alteraciones moleculares propias del tumor primario en el torrente circulatorio es particularmente codiciable, pues potencialmente reflejan los cambios genéticos y epigenéticos acontecidos en el tumor, y por tanto, podrían expresar una imagen más fiable de la biología intrínseca tumoral con respecto a la determinación del ADN plasmático total (94). Otra ventaja esencial es su capacidad para mostrar la evolución clonal del tumor en tiempo real durante el curso del tratamiento ya que pueden detectarse casos de mutaciones en plasma que no se observan en el tumor en el momento del diagnóstico, lo que otorga la posibilidad de optimizar la terapia dirigida contra los subclones dominantes en cualquier punto de la enfermedad (36, 94). Particularmente, el análisis de estas alteraciones específicas propias del tumor como *KRAS*, entre otras, es valioso porque, por una parte, estas alteraciones se presentan con elevada frecuencia en algunos tumores y en particular en el CCR como vimos en el apartado anterior, por otra es un evento genético que contribuye a la progresión tumoral (114, 280) y finalmente como hemos visto es preciso conocer el estado mutacional del gen *KRAS* previamente a instaurar los esquemas de quimioterapia adyuvante.

Sin embargo, en contra de este potencial beneficio también se esgrimen algunas limitaciones importantes, tanto en la elección de la mutación como en su detección. Así, podría rebatirse que la elección de una mutación para el estudio podría no ser representativa de la carga tumoral total, o tal vez que no sea una medida de los clones más agresivos dentro del propio tumor (98). Además, se han observado mutaciones circulantes en plasma que difieren de las presentes en el tumor primitivo, probablemente relacionadas con los fenómenos de heterogeneidad tumoral (6, 7, 107) o de expansión de clones ocultos en respuesta a presiones selectivas como la quimioterapia (103). Además, el grado de concordancia entre la detección plasmática mutacional y el tumor primario no es absoluto, y es sensible tanto a variables clínicopatológicas como a los métodos empleados para su detección, como veremos en profundidad más adelante (44, 64, 94, 214).

Otro de los grandes problemas a los que se enfrentan estos estudios deriva de la metodología empleada para su diagnóstico y cuantificación, dado que la carga de ADN

plasmático tumoral en plasma representa únicamente una mínima fracción (alrededor del 11%) del ADN plasmático total (70). Por tanto, son necesarias técnicas muy poderosas que consigan adecuadas tasas de sensibilidad y especificidad, ya que las secuencias nativas interfieren con la detección de las secuencias diana mutadas provocando un efecto dilucional (96, 114). Por estos motivos, en la explotación del ADN plasmático tumoral como herramienta diagnóstica es necesario que los estudios estén orientados, y requieren que la mutación del tumor se produzca frecuentemente en un lugar genómico específico conocido para su detección (86, 114, 169, 281) que ayuden a mitigar el efecto de confusión de la heterogeneidad intratumoral (163), como es el caso de las mutaciones en el gen *KRAS* que empleamos en nuestro trabajo.

Estos argumentos ponen manifiesto que en aquellos tumores en los que ha sido posible detectar una mutación específica podrían ser grandes candidatos para la monitorización de su ADN tumoral en sangre (110). Por ello, en esta parte de nuestro estudio nos planteamos cuál es el posible valor clínico de las determinaciones plasmáticas de *KRAS* mutado durante el perioperatorio.

5.6.1.- Valor en la estadificación tumoral

El pronóstico y el tratamiento de la enfermedad cancerosa se establece normalmente en base a la estadificación previa obtenida mediante el análisis anatomopatológico de la pieza tumoral, y en ocasiones por diversos motivos médicos o éticos no es posible su estudio. Por ello en este apartado quisimos indagar en el posible valor clínico de la detección del ADN plasmático tumoral durante el perioperatorio, tanto con la pieza tumoral como tras su exéresis inmediata y su relación con respecto a las variables clínicopatológicas y su pronóstico, y valorar el efecto de la cirugía en las cuantificaciones.

En primer lugar como hemos visto la sensibilidad en la detección del ADN plasmático tumoral es un reto en las determinaciones de laboratorio. Por ello, en la búsqueda de incrementar la **sensibilidad diagnóstica**, en los últimos años se han desarrollado estudios de secuenciación del genoma completo (86, 172, 282), así como estudios más personalizados mediante métodos de secuenciación dirigidos, que

establecen un incremento en el grado de correlación entre las mutaciones halladas en el tumor primario y su detección en sangre periférica que buscan la identificación de alteraciones genómicas somáticas que virtualmente se encuentran presentes en las células tumorales y cuya aparición en células normales es casi despreciable (101, 105, 106, 115, 163, 283). También se han probado paneles de detección, en los que se incluyen la detección conjunta de varias mutaciones u otras alteraciones moleculares conocidas que acontecen en el tumor primario (36, 94, 96, 110, 127, 169, 172). Sin embargo, nuestras determinaciones se llevaron a cabo mediante **PCR con sondas PNA**, que según autores tienen mayor sensibilidad que la secuenciación para el diagnóstico de mutaciones (166). Con ello nuestra tasa de detección del gen *KRAS* mutado plasmático en el perioperatorio fue del 50% de pacientes que presentaron dicha mutación en la pieza tumoral, cifra relativamente baja, pero en consonancia con algunos artículos publicados (94).

Además, se ha observado que la sensibilidad diagnóstica se encuentra ligada directamente al **estadio tumoral**, aspecto que queda patente en varios trabajos. Por ejemplo en un estudio sobre 223 pacientes con distintos tipos de cáncer se observó que la tasa de detección aumentaba significativamente desde el 47% de detección en estadio I de la enfermedad hasta el 55, 69 y 82% en estadios II, III y IV respectivamente (105). De forma similar en otro estudio elaborado sobre 191 pacientes con CCR se estudió la sensibilidad en función del número de copias mutadas de varias de las mutaciones más frecuentes detectadas en dicho tumor, y se relacionó de forma directa con el estadio tumoral (172). En este sentido otros autores destacan una estrecha correlación entre los niveles de ADN plasmático y la detección del gen *KRAS* mutado plasmático en fases avanzadas de la enfermedad (110), lo que les sugiere que en estadios avanzados el incremento del ADN plasmático tumoral podría tener mayor valor diagnóstico (170), y se correlacionaría directamente con el volumen tumoral (169).

Tomados en cuenta estos aspectos que inciden en la sensibilidad, para valorar su utilidad clínica estudiamos si existía alguna correlación entre la detección de ADN tumoral perioperatoria con distintas **variables clínicopatológicas** relacionadas con el género, tumor, estadio, invasividad tumoral en la pieza quirúrgica determinada por el grado de invasión linfática y perineural, progresión o exitus por causa tumoral o por cualquier causa y observamos que en nuestro estudio no se pudo alcanzar significación

estadística en ninguna de las variables mencionadas en el preoperatorio. No obstante, las **determinaciones postoperatorias** sí presentaron significación estadística con dos variables. Por una parte con la existencia de **metástasis**, hecho que se produjo en el 75% de los casos de pacientes que tuvieron ADN tumoral frente al 25% de los que no lo tuvieron. Por otra con la variable de **progresión tumoral**, que se produjo en el 75% de los pacientes con ADN tumoral tras la cirugía frente al 12,5% que progresaron sin ADN tumoral tras la cirugía. Estos datos redundan en el hecho de que la sensibilidad es mayor en pacientes con estadios más avanzados, y que presentan por tanto una mayor carga tumoral, como se ha comentado anteriormente (170, 172, 284). Sin embargo, estos hallazgos no se verían apoyados por el hecho de que no se alcanzase significación estadística en la determinación preoperatoria, con toda la masa tumoral intacta como fuente potencial de liberación de ADN mutado.

En cuanto a la progresión tumoral como variable independiente durante el postoperatorio inmediato no es un evento recogido como tal en la literatura. El resto de variables han sido estudiados principalmente ligados al tumor primario, como vimos en el apartado anterior. De esta forma **no existe una asociación clara entre las determinaciones de ADN plasmático circulante y el resto de variables en cuanto a la localización y diversos aspectos relacionados con la agresividad anatomopatológica del tumor primario, lo que nos inclina a pensar que estas determinaciones en el perioperatorio inmediato tienen un valor clínico limitado en la estadificación tumoral.**

5.6.2.- Valor en el pronóstico de la enfermedad

Donde el papel de estas determinaciones parece tener una mayor relevancia con amplio respaldo bibliográfico es en el pronóstico, predicción y monitorización de respuesta a los tratamientos, aspecto que biológicamente se sustenta en la corta vida media del ADN plasmático tumoral circulante, que se estima menor de 1,5 horas (30, 96, 105).

El valor pronóstico ha sido destacado en algunos trabajos relevantes. Así, en un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama se proporcionó la prueba de

concepto de que el ADN plasmático tumoral circulante presentaba una gran sensibilidad pronóstica como biomarcador para la carga tumoral en el cáncer de mama metastásico. Específicamente estos investigadores encontraron que los niveles de ADN plasmático tumoral mostraron una mejor asociación dinámica y mayor correlación con los cambios en la carga tumoral que el Ca 15-3 o las células circulantes (106). En este mismo sentido en otro estudio realizado en pacientes intervenidos de CCR, algunos de ellos con metástasis hepáticas sincrónicas mostraron que las determinaciones de ADN plasmático tumoral en el postoperatorio inmediato y a medio plazo mostraron una mejor correlación clínica que los marcadores CEA y Ca 19.9 en relación con el grado de resección tumoral, recurrencia de la enfermedad, así como con la monitorización a tratamientos adyuvantes en terapias paliativas biológicas hasta varios meses después de la cirugía (110). Otros autores han destacado la relevancia de la correlación en la detección de mutaciones del gen *KRAS* en plasma y tejido tumoral como factor de mal pronóstico (166)

En nuestro estudio en cuanto a su valor pronóstico los valores plasmáticos preoperatorios no mostraron significación estadística, al no obtener relación con el *OS* ni tampoco con la supervivencia relacionada con el cáncer. Sin embargo, no se pudieron calcular las posibles relaciones de la detección de las mutaciones del gen *KRAS* plasmático postquirúrgico con el tiempo de *OS* y cáncer específicas porque no se encontraron pacientes con ADN plasmático tumoral negativo que hubieran fallecido. Por tanto este es un hallazgo inequívoco, más allá de los resultados estadísticos que confieren un potencial valor pronóstico de respuesta al tratamiento quirúrgico y/o a la quimioterapia adyuvante recibida por varios de nuestros pacientes durante el seguimiento del estudio. De este modo se refuerza la idea de su valor pronóstico para el tratamiento en cuanto a la *OS* y *SV* específica por cáncer.

Múltiples trabajos apuntalan incuestionablemente este valor pronóstico en términos de *OS* y/o *DFS* (127). Para algunos autores su determinación en un panel de mutaciones somáticas en suero entre las que se encuentra el gen *KRAS* es un factor predictor de recurrencia mayor que el estadio de *DUKES* (111). Otros establecen el significado pronóstico entre la cirugía y el estadio II de la enfermedad (285). Para concluir este epígrafe se han realizado varios metanálisis recientes que han corroborado el valor

pronóstico adverso de la detección de la mutación del gen *KRAS* plasmático en diversos tipos de tumores (286) y en el CCR en particular (171) en cuanto a una peor *OS* y *DFS*.

En relación a su valor predictivo se ha visto en general que los pacientes con altos niveles pretratamiento de mutaciones plasmáticas del gen *KRAS* tienen peor respuesta a los tratamientos que los que presentan niveles más bajos. Los datos permiten estratificar el riesgo en base a la cuantificación, lo que para algunos autores podría seleccionar aquellos pacientes con enfermedad “*KRAS* dominante” de otros en los que los niveles son más bajos y potencialmente podrían beneficiarse de tratamientos adyuvantes (170). De este modo, en un metanálisis publicado en 2010 se comprobó un hallazgo ampliamente constatado en la literatura, que los pacientes con detección de mutaciones plasmáticas en los genes *KRAS* y *BRAF* presentaron menores tasas de respuesta a los tratamientos con anti-EGFR, tiempos de *DFS* más cortos y de *OS* (287). En pacientes con enfermedad metastásica pueden proporcionar mediciones instantáneas de la carga clonal tumoral para detectar precozmente la recurrencia (170, 282), como también la obtención de una repetida **monitorización** de los pacientes durante el tratamiento (114, 170, 282). Permiten identificar mutaciones específicas que surgen durante la terapia ligadas principalmente a las terapias de bloqueo de EGFR (16, 20, 21, 23, 28, 52), ya que distintos tipos de agentes quimioterápicos tienen como objetivo las vías de *KRAS*, como de *BRAF*, *EGFR* o *p53* (170, 280, 287), y requieren del conocimiento de su estado mutacional para predecir la respuesta terapéutica. Esto nos permitiría indagar en aspectos claves como las posibles causas de un fracaso terapéutico, anticipar nuevas estrategias de diagnóstico o plantear nuevas directrices de tratamiento como alternativa a la toma de biopsias.

Las conclusiones finales de este epígrafe podemos resumirlas en que las determinaciones de ADN plasmático tumoral en el perioperatorio mediante PCR con sonda PNA tienen un valor clínico cuestionable para la mayoría de las variables relacionadas con la estadificación, y su sensibilidad diagnóstica se ha visto estrechamente relacionada con el estadio tumoral. Donde sí está claramente establecido su valor es en el pronóstico y en la predicción y monitorización de respuesta a los tratamientos.

5.7.- EFECTO DE LA CIRUGÍA EN LOS NIVELES PERIOPERATORIOS DE ADN PLASMÁTICO MUTADO Y SU RELACIÓN CLÍNICA

A día de hoy, la cirugía conforma la piedra angular del tratamiento del CCR, tanto en estadios de enfermedad local como metastásicos candidatos a una resección completa radical. La mortalidad y las tasas de supervivencia quedan altamente ligadas al estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico y durante el tratamiento. De hecho, a pesar del adecuado tratamiento quirúrgico con o sin quimioterapia adyuvante el 30-50% de los pacientes presentará recurrencia de la enfermedad, desarrollará metástasis y probablemente morirá dentro de los 5 primeros años de la enfermedad (288). Además, en la práctica clínica habitual, el seguimiento de los pacientes con cáncer se apoya en la utilización de proteínas séricas cuya sensibilidad diagnóstica es insuficiente para el diagnóstico precoz. Así, en el CCR el CEA ha mostrado mejor sensibilidad que el Ca19.9, con una tasa de sensibilidad diagnóstica directamente asociada al estadio tumoral, de modo que en estadios iniciales A y B es del 40% A y en estadio C alcanza un 70%. Por estos motivos únicamente han mostrado utilidad en el seguimiento de la enfermedad, y se ha propiciado la búsqueda de nuevos biomarcadores para monitorizar la enfermedad cancerosa (289-292). El auge experimentado por los CNAPS ha recogido este contexto para erigirse potencialmente como nuevos biomarcadores que guíen a los clínicos a modo de “biopsia líquida” en el diagnóstico y monitorización de la enfermedad tumoral (293).

Por ello, en nuestro estudio nos planteamos la posibilidad investigar la posible asociación entre la detección de ADN plasmático tumoral con mutación del oncogen *KRAS* con la cirugía en el perioperatorio inmediato. Buscamos con ello por una parte evaluar su posible función clínica como biomarcador en la determinación del estadio y pronóstico de la enfermedad tumoral; por otra parte, reflexionar su posible función biológica en el perioperatorio tras la exéresis del tumor primario.

Desde el punto de vista clínico, es un hecho contrastable que el valor de los CNAPS en el perioperatorio está evolucionando y cobrando cada vez mayor relevancia. Fundamentados en la corta vida media del ADN plasmático tumoral por su rápida degradación, (44, 96, 294) estos biomarcadores podrían demostrar diseminación de la

enfermedad en el momento de la cirugía del tumor primario y por tanto, estimar el grado de resección quirúrgica tumoral. Además de ello, varios estudios han indagado en el valor de las determinaciones postoperatorias del ADN plasmático tumoral, no sólo para evaluar su valor en la monitorización de la cirugía, sino también como marcador pronóstico de la enfermedad (161, 278).

Si atendemos a la valoración como biomarcadores del valor clínico en la **monitorización del tratamiento quirúrgico** de estas determinaciones en un trabajo con pacientes con CCR que utilizó un panel de detección de mutaciones somáticas frecuentes, entre las que se encontraba el gen *KRAS* durante el seguimiento, el ADN tumoral típicamente desapareció después de la cirugía curativa R0, mientras que en pacientes con tratamiento no curativo (cirugía R2 o cirugía paliativa) el ADN plasmático tumoral permaneció detectable inmediatamente después de la operación (110). Otro estudio realizado sobre pacientes con cáncer gástrico también demostró su valor en la estimación de la resección curativa (278). En estadios avanzados de la enfermedad tumoral se encuentran trabajos como los de Diehl 2008 sobre pacientes con CCR y metástasis, que en un estudio de características similares al nuestro mediante la técnica BEAMing, estudió las oscilaciones plasmáticas de 18 pacientes acontecidas en un conjunto de mutaciones somáticas entre las que se incluyeron *KRAS*, *APC*, *p53* y *PIK3CA*. Se tomaron determinaciones previas a la intervención, y de forma seriada al primer día, posteriormente entre los días 2-10, y finalmente entre los días 13-56 del postoperatorio, y obtuvieron una buena correlación entre las oscilaciones de estos valores y la extensión de la cirugía. De este modo, los pacientes con niveles persistentemente elevados de forma inmediata tras la intervención tuvieron generalmente recurrencia en el primer año de seguimiento (96). De este modo se sugiere que los niveles de ADN plasmático tumoral reflejan con fidelidad la carga tumoral sistémica tras la cirugía, lo que permite asesorar acerca de si hay presencia de enfermedad residual, y concretamente tras la cirugía de metástasis podrían ser un factor pronóstico de recurrencia (36).

En nuestro trabajo, estudiamos estadísticamente los cambios acontecidos en las detecciones de ADN tumoral antes y después de la intervención quirúrgica que sirvió para la **monitorización del tratamiento**, y se obtuvieron algunos resultados destacables. Así, pudimos observar como todos los pacientes en estadios iniciales y

potencialmente más “curables”, es decir pT1 y pT2, negativizaron los valores de ADN plasmático tumoral tras la cirugía con respecto a los pacientes en estadios más avanzados pT3 y pT4, aunque no pudo alcanzarse la significación estadística.

De una forma similar con respecto a los pacientes con carcinomatosis, la cirugía no modificó los valores de cuantificación, de modo que todos los pacientes con ADN plasmático tumoral antes de la cirugía, permanecieron con dicho ADN tras la intervención. En los pacientes sin carcinomatosis sólo permaneció el ADN plasmático tumoral postquirúrgico en el 20% de los pacientes y no se alcanzó la significación estadística en los cambios.

En ambos casos, y a pesar de no conseguirse la significación estadística, los resultados apuntan a una mejor respuesta a la cirugía en estadios iniciales, con un mejor “aclaramiento” del ADN plasmático tumoral que en estadios más avanzados o en pacientes con carcinomatosis, donde la enfermedad no es completamente erradicada, lo que redundaría en el concepto de la capacidad de monitorización de la enfermedad en tiempo real y su relación con la extensión de la cirugía (36, 96).

Al estudiar los pacientes con metástasis pudo observarse que en la mitad de ellos podía detectarse ADN plasmático tumoral preoperatorio, y en un 25% más se positivizaron en el postoperatorio, de modo que en la mayoría de ellos (75%) pudo detectarse ADN plasmático tumoral. Por el contrario, el 75% de los pacientes sin metástasis no presentaron ADN plasmático tumoral tras la cirugía, de forma que la mitad de ellos se negativizaron tras la cirugía, resultado que sí obtuvo significación estadística. Al igual que en la literatura, a mayor carga tumoral hubo mayor índice de detección y cuantificación (36). La contribución de la cirugía en “negativizar” el ADN plasmático tumoral de pacientes sin metástasis entra dentro de su capacidad de monitorizar la respuesta al tratamiento. La excepción a estos hallazgos la constituye un paciente (T110), con buena detección de ADN plasmático tumoral en el preoperatorio y metástasis hepáticas sincrónicas al diagnóstico, que tras una cirugía radical que incluyó el tumor primario y las resecciones hepáticas de las lesiones metastásicas negativizó los niveles plasmáticos de ADN en el postoperatorio. Actualmente se encuentra libre de enfermedad, y el aclaramiento del ADN plasmático tumoral parece conferirle un efecto

pronóstico positivo que reflejaría una extensión radical de la cirugía, en consonancia con lo publicado por Diehl et al (96).

Más complejo de interpretar serían el 25% de los casos de pacientes con metástasis, en los que a pesar de la exéresis del tumor primario con la consiguiente reducción de carga tumoral, pudo detectarse únicamente ADN plasmático tumoral en el postoperatorio. Presumiblemente a estos valores en pacientes sometidos a cirugías no radicales pueden influir varios factores, como el incremento de liberación de ácidos nucleicos por las lesiones metastásicas en el contexto del estrés fisiológico del tras la intervención, o la inmunodepresión postoperatoria entre otros. A este fenómeno también podría contribuir la liberación de ácidos nucleicos por las células tumorales circulantes (295, 296). Sin embargo, estudios realizados tanto en modelos animales (297), como en humanos (105, 106) sugieren que en base a la escasa cantidad de células tumorales presentes en la circulación, su contribución al ADN tumoral circulante tendría un efecto mínimo. Por ello podríamos inferir una posible menor contribución de las mismas en la evolución de la enfermedad (297).

La cirugía en estadios avanzados no redujo la detección de ADN plasmático tumoral, resultado que obtuvo significación estadística, de modo que el 85,7% de los pacientes en los que se detectó ADN plasmático tumoral tras la intervención presentaron evolución de su enfermedad o desarrollaron metástasis. De la misma manera, el 77,7% de los pacientes que no progresaron o desarrollaron metástasis no tenían ADN plasmático tumoral tras la cirugía, de los cuales el 44,4% se negativizaron tras la intervención, lo que podría indicar un posible efecto protector de la cirugía para el grupo de pacientes en estadios precoces. Estos hallazgos nuevamente ponen de manifiesto la capacidad para monitorizar la enfermedad y actuar como factor pronóstico, en consonancia con lo expuesto en la literatura (110). Cabe destacar como ejemplo a este respecto el caso del paciente T87, con detección negativa preoperatoria y que tras la cirugía se detectó ADN plasmático tumoral. El paciente presentó rápida progresión de la enfermedad y metástasis.

Aunque nuestros resultados tienen importantes limitaciones, principalmente ligadas al escaso número de pacientes reclutado con mutaciones, sí parecen apuntar que en aquellos pacientes con mutaciones la cirugía podría tener un efecto protector en estadios

iniciales, mientras que en fases más avanzadas la reducción de masa tumoral tiene escaso impacto en el pronóstico y supervivencia de los pacientes.

En base a nuestros hallazgos es lícito plantearse el valor clínico real de la cirugía en determinados pacientes. Si los valores del ADN plasmático tumoral pueden predecir recurrencia o enfermedad residual tras cirugía potencialmente radical, o pacientes con cirugía supuestamente curativa desarrollan progresión con plasmas que mantienen capacidades oncogénicas. Tal vez estos hallazgos nos hagan reflexionar que, con el conocimiento de las bases moleculares del cáncer, y sus posibilidades de detección en sangre circulante, podamos comprender mejor el comportamiento intrínseco del tumor, y pueda manejarse como una entidad independiente, con tratamientos y abordajes únicos y personalizados.

5.8.- COMENTARIO FINAL

La utilización de los CNAPS, y más concretamente del ADN plasmático como herramienta clínica en el terreno de la oncología es un hecho constatable en la literatura en las últimas dos décadas, pues refleja potencialmente de forma rigurosa los fenómenos de carcinogénesis y progresión tumoral con mayor precisión que las seroproteínas empleadas rutinariamente en la práctica médica habitual.

En el presente estudio, a pesar de las limitaciones que derivan del escaso número de pacientes reclutados y de la baja incidencia de mutaciones del oncogen *KRAS* tumoral, se pone de manifiesto el valor clínico predictivo y pronóstico de la cuantificación del ADN plasmático y detección del ADN plasmático tumoral en el perioperatorio inmediato, como también su capacidad en la monitorización de la enfermedad cancerosa. Como aspecto limitante en el empleo de estas determinaciones que hemos podido corroborar en nuestro trabajo cabe destacar la heterogeneidad metodológica en las técnicas de laboratorio empleadas en la cuantificación del ADN plasmático, lo que pone de manifiesto la falta de uniformidad en los criterios de valoración de los resultados obtenidos en los diferentes estudios publicados.

De la mano del desarrollo tecnológico en los últimos años se han conseguido grandes avances en la caracterización del genoma de distintos tipos de tumores. Con su conocimiento y detección en sangre periférica es esperable una mejora en la sensibilidad y especificidad en los métodos de laboratorio que permitan homogeneizar los resultados para que se constituyan como herramientas fiables y reproducibles. De este modo se podrán personalizar los perfiles genéticos de los pacientes con tumores y los CNPAS tendrán argumentos para erigirse como biopsias líquidas útiles en la práctica clínica rutinaria, lo que permitirá explotar mejor el concepto de medicina personalizada, la monitorización de la enfermedad y predicción de respuesta a los tratamientos.

6.- CONCLUSIONES

1.- Los niveles prequirúrgicos de ADN plasmático total obtenidos mediante las distintas técnicas de laboratorio utilizadas no se correlacionaron entre sí. Esto apoya la idea de que no será posible una aplicación clínica de la cuantificación del ADN libre plasmático en tanto no se consensúen y estandaricen estas técnicas.

2.- La cuantificación preoperatoria de ADN plasmático total no se correlacionó, en ningún caso, con ninguna de las variables clinicopatológicas analizadas.

3.- Los pacientes con mayores niveles pre y postoperatorios de ADN plasmático total, medidos por PCR en tiempo real, presentaron menor tiempo de progresión de la enfermedad y supervivencia total.

4.- De los pacientes con mutaciones el gen *KRAS*, únicamente en la mitad se pudo detectar ADN mutado en plasma, mediante PCR en tiempo real, antes de la cirugía, no correlacionándose con la supervivencia total ni libre de enfermedad. Sin embargo, la detección de este ADN en el postoperatorio sí estuvo asociado con la presencia de enfermedad diseminada y a un mayor porcentaje de progresión de la enfermedad.

5.- La utilidad clínica del análisis del DNA circulante en plasma en el manejo del cáncer colorrectal está condicionada a la técnica molecular empleada, la diversidad de marcadores génicos y a la repetición de los análisis en el curso de la enfermedad. Se hace necesaria la estandarización de técnicas, paneles de marcadores y protocolos para poder llevar estas determinaciones a la práctica clínica.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Beauchamp RD, Mattox KL, Evers BM. Sabiston. Tratado de patología quirúrgica. McGraw-Hill. Interamericana ed. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company; 2003. 2001 p.
3. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274(5293):1672-7.
4. Meguerditchian AN, Bullard Dunn K. Biomarkers and targeted therapeutics in colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013;22(4):841-55.
5. Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest*. 1994;70(1):6-22.
6. Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Silva J, Bonilla F. Heterogeneous tumor clones as an explanation of discordance between plasma DNA and tumor DNA alterations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;31(3):300-1.
7. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883-92.
8. Improta G, Zupa A, Possidente L, Tartarone A, Pedicini P, Nappi A, et al. Coexistence of two different mutations in codon 12 of the Kras gene in colorectal cancer: Report of a case supporting the concept of tumoral heterogeneity. *Oncol Lett*. 2013;5(5):1741-3.
9. Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA. Primary and secondary prevention of colorectal cancer. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2014;7:33-46.
10. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.
11. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Hernández Barrera V, Lope V, et al. [State of cancer in Spain: incidence]. *An Sist Sanit Navar*. 2004;27(2):165-73.
12. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
13. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(9):1423-31.
14. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
15. Wei EK, Colditz GA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Rosner BA. Cumulative risk of colon cancer up to age 70 years by risk factor status using data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 2009;170(7):863-72.
16. Yusof AS, Isa ZM, Shah SA. Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a systematic review of cohort studies (2000-2011). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(9):4713-7.
17. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer*. 2004;108(3):433-42.
18. Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151-64.

19. Alós Company R, Buch Villa E, Cerdán Miguel J, Cervantes Rupérez A, Esclapez Valero P, Espí Macía A, et al. Guías clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. Cirugía Colorrectal. Arán ediciones S.A. ed. Madrid 2000. 504 p.
20. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(4):220-41.
21. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1688-94.
22. Tsang AH, Cheng KH, Wong AS, Ng SS, Ma BB, Chan CM, et al. Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(14):3847-57.
23. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD, et al. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in Spain. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 3:iii76-82.
24. Stock C, Pulte D, Haug U, Brenner H. Subsite-specific colorectal cancer risk in the colorectal endoscopy era. *Gastrointest Endosc.* 2012;75(3):621-30.
25. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(6):366-78.
26. Atkin WS, Edwards R, Kralj-Hans I, Wooldrage K, Hart AR, Northover JM, et al. Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;375(9726):1624-33.
27. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36.
28. Rodrigo L, Riestra S. [Diet and colon cancer]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007;99(4):183-9.
29. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):769-80.
30. Kin C, Kidess E, Poultsides GA, Visser BC, Jeffrey SS. Colorectal cancer diagnostics: biomarkers, cell-free DNA, circulating tumor cells and defining heterogeneous populations by single-cell analysis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(6):581-99.
31. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig.* 2011;103(1):29-35.
32. Jancík S, Drábek J, Radzioch D, Hajdúch M. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:150960.
33. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):937-48.
34. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992;359(6392):235-7.
35. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science.* 1989;244(4901):207-11.
36. Kidess E, Heirich K, Wiggin M, Vysotskaia V, Visser BC, Marziali A, et al. Mutation profiling of tumor DNA from plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation detection platform. *Oncotarget.* 2015;6(4):2549-61.

37. Domínguez Berzosa C. Detección y análisis del ADN extracelular en plasma de pacientes de cáncer colorrectal: evaluación de la capacidad del plasma de transfectar y transformar células en cultivo. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2010.
38. Ramírez N, Bandrés E, Navarro A, Pons A, Jansa S, Moreno I, et al. Epigenetic events in normal colonic mucosa surrounding colorectal cancer lesions. *Eur J Cancer*. 2008;44(17):2689-95.
39. Suppiah A, Greenman J. Clinical utility of anti-p53 auto-antibody: systematic review and focus on colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(29):4651-70.
40. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001008.
41. Bahnassy AA, Zekri AR, Salem SE, Abou-Bakr AA, Sakr MA, Abdel-Samiaa AG, et al. Differential expression of p53 family proteins in colorectal adenomas and carcinomas: Prognostic and predictive values. *Histol Histopathol*. 2014;29(2):207-16.
42. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261-8.
43. 1991 JE, 15:299-360. Clinical use of tumor markers in oncology. 1991.
44. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775(1):181-232.
45. González-Masiá JA, García-Olmo D, García-Olmo DC. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *Onco Targets Ther*. 2013;6:819-32.
46. MANDEL P, CLAVERT J, MANDEL. [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3-4):244-6.
47. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-50.
48. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318-22.
49. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):67-71.
50. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994;86(4):774-9.
51. Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):806-11.
52. García-Olmo DC, Samos J, Picazo MG, Asensio AI, Toboso I, García-Olmo D. Release of cell-free DNA into the bloodstream leads to high levels of non-tumor plasma DNA during tumor progression in rats. *Cancer Lett*. 2008;272(1):133-40.
53. Gahan PB, Anker P, Stroun M. Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:7-17.
54. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Von Pawel J, Schalhorn A, et al. Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;945:93-102.
55. Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol*. 2010;3(5):478-81.
56. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvalld JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.

57. Samos J, García-Olmo DC, Picazo MG, Rubio-Vitaller A, García-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma/serum and tumor progression: are apoptotic bodies involved? An experimental study in a rat cancer model. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:165-73.
58. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E. Horizontal transfer of DNA and the "genometastasis hypothesis". *Blood.* 2000;95(2):724-5.
59. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010;70(2):560-7.
60. García-Olmo DC, García-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genometastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1-2):153-61.
61. Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Taja-Chayeb L, Anker P, Herrera-Goepfert R, Medina-Velázquez LA, et al. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS One.* 2012;7(12):e52754.
62. Mittra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci.* 2012;37(2):301-12.
63. Mittra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci.* 2015;40(1):91-111.
64. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker--a critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21-22):1611-24.
65. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-65.
66. Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal.* 2003;17(4):103-7.
67. Choi JJ, Reich CF, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology.* 2005;115(1):55-62.
68. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 2001;313(1-2):139-42.
69. Thijssen MA, Swinkels DW, Ruers TJ, de Kok JB. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer Res.* 2002;22(1A):421-5.
70. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(45):16368-73.
71. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas.* 1998;17(1):89-97.
72. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 2008;387(1-2):55-8.
73. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Fertig G, Fürst H, Schmeller N, et al. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(7):596-605.

74. Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem.* 2001;47(8):1488-9.
75. Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:218-21.
76. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. *Curr Mol Med.* 2010;10(2):142-65.
77. Serrano-Heras G, Domínguez-Berzosa C, Collantes E, Guadalajara H, García-Olmo D, García-Olmo DC. NIH-3T3 fibroblasts cultured with plasma from colorectal cancer patients generate poorly differentiated carcinomas in mice. *Cancer Lett.* 2012;316(1):85-90.
78. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Battaglia L, Sozzi G, et al. Quantitative analysis of plasma DNA in colorectal cancer patients: a novel prognostic tool. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:185-90.
79. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001;61(12):4675-8.
80. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Kupis W, Maszkowska-Kopij K, Dancewicz M, Kowalewski J, et al. Quantitative analysis of free-circulating DNA in plasma of patients with resectable NSCLC. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12 Suppl 1:S3-9.
81. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;64(1):92-7.
82. Yoon KA, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *J Mol Diagn.* 2009;11(3):182-5.
83. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol.* 2008;27(8):415-21.
84. Hashad D, Sorour A, Ghazal A, Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *J Clin Lab Anal.* 2012;26(6):467-72.
85. Sai S, Ichikawa D, Tomita H, Ikoma D, Tani N, Ikoma H, et al. Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(4C):2747-51.
86. Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, Sai S, Tani N, Ikoma H, et al. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(4C):2737-41.
87. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer.* 1983;51(11):2116-20.
88. Zhang R, Shao F, Wu X, Ying K. Value of quantitative analysis of circulating cell free DNA as a screening tool for lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2010;69(2):225-31.
89. Chang HW, Lee SM, Goodman SN, Singer G, Cho SK, Sokoll LJ, et al. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(22):1697-703.

90. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao K, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta*. 2002;321(1-2):77-87.
91. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Müller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem*. 2004;50(9):1668-70.
92. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004;23(6-7):879-83.
93. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. 2000;46(3):319-23.
94. Lecomte T, Ceze N, Dorval E, Laurent-Puig P. Circulating free tumor DNA and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34(12):662-81.
95. García-Olmo DC, Picazo MG, Toboso I, Asensio AI, García-Olmo D. Quantitation of cell-free DNA and RNA in plasma during tumor progression in rats. *Mol Cancer*. 2013;12:8.
96. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.
97. Cheng C, Omura-Minamisawa M, Kang Y, Hara T, Koike I, Inoue T. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy. *Cancer Sci*. 2009;100(2):303-9.
98. Ocaña A, Díez-González L, García-Olmo DC, Templeton AJ, Vera-Badillo F, José Escribano M, et al. Circulating DNA and Survival in Solid Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(2):399-406.
99. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, et al. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(18 Pt 1):5981-7.
100. Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:162-70.
101. Network CGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
102. Siravegna G, Bardelli A. Blood circulating tumor DNA for non-invasive genotyping of colon cancer patients. *Mol Oncol*. 2016;10(3):475-80.
103. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DW, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med*. 2012;4(136):136ra68.
104. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med*. 2012;4(162):162ra54.
105. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24.
106. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1199-209.
107. Zhang J, Fujimoto J, Wedge DC, Song X, Seth S, Chow CW, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014;346(6206):256-9.

108. Maire F, Micard S, Hammel P, Voitot H, Lévy P, Cugnenc PH, et al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of KRAS2 mutations in circulating DNA. *Br J Cancer*. 2002;87(5):551-4.
109. Castells A, Puig P, Móra J, Boadas J, Boix L, Urgell E, et al. K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol*. 1999;17(2):578-84.
110. Levy M, Benesova L, Lipska L, Belsanova B, Minarikova P, Veprekova G, et al. Utility of cell-free tumour DNA for post-surgical follow-up of colorectal cancer patients. *Anticancer Res*. 2012;32(5):1621-6.
111. Ryan BM, Lefort F, McManus R, Daly J, Keeling PW, Weir DG, et al. A prospective study of circulating mutant KRAS2 in the serum of patients with colorectal neoplasia: strong prognostic indicator in postoperative follow up. *Gut*. 2003;52(1):101-8.
112. Gadgeel SM, Cote ML, Schwartz AG, Matherly LH, Wozniak A, Bepler G. Parameters for individualizing systemic therapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):196-204.
113. Rosell R, Vergnenegre A, Liu B, Cobo M, Massuti B, Wei J, et al. Biomarkers in lung oncology. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(6):508-14.
114. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(6):426-37.
115. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013;497(7447):108-12.
116. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res*. 2003;63(14):3966-8.
117. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem*. 2006;52(6):1062-9.
118. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4270-6.
119. Jiang WW, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2673-6.
120. Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clin Chim Acta*. 2011;412(23-24):2141-5.
121. Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(11):1651-6.
122. Chan KC, Leung SF, Yeung SW, Chan AT, Lo YM. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4141-5.
123. Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, Ng MH, Hjelm NM. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1999;59(16):3899-903.
124. Casciano I, Vinci AD, Banelli B, Brigati C, Forlani A, Allemanni G, et al. Circulating Tumor Nucleic Acids: Perspective in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2010;5(2):75-80.

125. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Bürki N, Diesch C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(1):e16080.
126. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology*. 2007;39(2):197-207.
127. Frattini M, Gallino G, Signoroni S, Balestra D, Lusa L, Battaglia L, et al. Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2008;263(2):170-81.
128. Tsutsui M, Iizuka N, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, et al. Methylated cyclin D2 gene circulating in the blood as a prognosis predictor of hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2010;411(7-8):516-20.
129. Ling ZQ, Zhao Q, Zhou SL, Mao WM. MSH2 promoter hypermethylation in circulating tumor DNA is a valuable predictor of disease-free survival for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2012;38(4):326-32.
130. Goessl C, Müller M, Straub B, Miller K. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol*. 2002;41(6):668-76.
131. Iriyama C, Tomita A, Hoshino H, Adachi-Shirahata M, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, et al. Using peripheral blood circulating DNAs to detect CpG global methylation status and genetic mutations in patients with myelodysplastic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;419(4):662-9.
132. Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, et al. Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res*. 2005;65(4):1141-5.
133. Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, Pantel K. Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:25-32.
134. Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, et al. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2005;92(12):2181-4.
135. Schwarzenbach H, Eichelser C, Kropidlowski J, Janni W, Rack B, Pantel K. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2012;18(20):5719-30.
136. Sunami E, Shinozaki M, Higano CS, Wollman R, Dorff TB, Tucker SJ, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin Chem*. 2009;55(3):559-67.
137. Garcia JM, Garcia V, Silva J, Peña C, Dominguez G, Sanchez A, et al. Extracellular tumor DNA in plasma and overall survival in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(7):692-701.
138. Taback B, O'Day SJ, Boasberg PD, Shu S, Fournier P, Elashoff R, et al. Circulating DNA microsatellites: molecular determinants of response to biochemotherapy in patients with metastatic melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(2):152-6.
139. Chan KC, Lo YM. Circulating tumour-derived nucleic acids in cancer patients: potential applications as tumour markers. *Br J Cancer*. 2007;96(5):681-5.
140. Jones K, Nourse JP, Keane C, Crooks P, Gottlieb D, Ritchie DS, et al. Tumor-specific but not nonspecific cell-free circulating DNA can be used to monitor disease response in lymphoma. *Am J Hematol*. 2012;87(3):258-65.

141. Lei KI, Chan LY, Chan WY, Johnson PJ, Lo YM. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol.* 2000;111(1):239-46.
142. Lo YM, Chan WY, Ng EK, Chan LY, Lai PB, Tam JS, et al. Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(7):1856-9.
143. Lo YM. Prognostic implication of pretreatment plasma/serum concentration of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2001;55(7):362-5.
144. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science.* 2000;287(5460):2017-9.
145. Yu M. Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. *Adv Clin Chem.* 2012;57:99-138.
146. Xia P, An HX, Dang CX, Radpour R, Kohler C, Fokas E, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:454.
147. Mithani SK, Smith IM, Zhou S, Gray A, Koch WM, Maitra A, et al. Mitochondrial resequencing arrays detect tumor-specific mutations in salivary rinses of patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7335-40.
148. Jerónimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, et al. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene.* 2001;20(37):5195-8.
149. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol.* 1927;8(6):519-30.
150. Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, Rainer TH, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem.* 2003;49(5):719-26.
151. Lee HC, Chang CM, Chi CW. Somatic mutations of mitochondrial DNA in aging and cancer progression. *Ageing Res Rev.* 2010;9 Suppl 1:S47-58.
152. Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest.* 2002;20(4):557-69.
153. Kassaei K, Habbe N, Mullendore ME, Karikari CA, Maitra A, Feldmann G. Mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2006;37(2-3):57-64.
154. Mehra N, Penning M, Maas J, van Daal N, Giles RH, Voest EE. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 1):421-6.
155. Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, Takase T, Taguchi M, Kasai Y, et al. Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2001;94(3):429-31.
156. Okochi O, Hibi K, Uemura T, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, et al. Detection of mitochondrial DNA alterations in the serum of hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2002;8(9):2875-8.
157. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer.* 2009;8:105.
158. Zachariah RR, Schmid S, Buerki N, Radpour R, Holzgreve W, Zhong X. Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol.* 2008;112(4):843-50.

159. Ellinger J, Müller DC, Müller SC, Hauser S, Heukamp LC, von Ruecker A, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol Oncol*. 2012;30(4):509-15.
160. Kuo YB, Chen JS, Fan CW, Li YS, Chan EC. Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin Chim Acta*. 2014;433:284-9.
161. Cassinotti E, Boni L, Segato S, Rausei S, Marzorati A, Rovera F, et al. Free circulating DNA as a biomarker of colorectal cancer. *Int J Surg*. 2013;11 Suppl 1:S54-7.
162. Pedersen SK, Symonds EL, Baker RT, Murray DH, McEvoy A, Van Doorn SC, et al. Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia. *BMC Cancer*. 2015;15:654.
163. Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2016;65(4):625-34.
164. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, et al. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(8):1482-9.
165. Perrone F, Lampis A, Bertan C, Verderio P, Ciniselli CM, Pizzamiglio S, et al. Circulating free DNA in a screening program for early colorectal cancer detection. *Tumori*. 2014;100(2):115-21.
166. Xu JM, Liu XJ, Ge FJ, Lin L, Wang Y, Sharma MR, et al. KRAS mutations in tumor tissue and plasma by different assays predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33:104.
167. Mansour H. Cell-free nucleic acids as noninvasive biomarkers for colorectal cancer detection. *Front Genet*. 2014;5:182.
168. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004;22(20):4157-64.
169. Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(12):2984-91.
170. Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):1177-85.
171. Basnet S, Zhang ZY, Liao WQ, Li SH, Li PS, Ge HY. The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer*. 2016;7(9):1105-13.
172. Lin JK, Lin PC, Lin CH, Jiang JK, Yang SH, Liang WY, et al. Clinical relevance of alterations in quantity and quality of plasma DNA in colorectal cancer patients: based on the mutation spectra detected in primary tumors. *Ann Surg Oncol*. 2014;21 Suppl 4:S680-6.
173. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Rattcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3902-8.
174. Allen D, Butt A, Cahill D, Wheeler M, Popert R, Swaminathan R. Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:76-80.
175. Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2006;243(1):64-70.

176. Wieczorek AJ, Sitaramam V, Machleidt W, Rhyner K, Perruchoud AP, Block LH. Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer Res.* 1987;47(23):6407-12.
177. Lo KW, Lo YM, Leung SF, Tsang YS, Chan LY, Johnson PJ, et al. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chem.* 1999;45(8 Pt 1):1292-4.
178. Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1999;5(8):1961-5.
179. Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoll R, Marugán M, Tormo M, et al. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: a simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest.* 2001;81(5):767-9.
180. Silva JM, Rodriguez R, Garcia JM, Muñoz C, Silva J, Dominguez G, et al. Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells. *Gut.* 2002;50(4):530-4.
181. Lledó SM, Garcia-Granero E, Dasí F, Ripoli R, García SA, Cervantes A, et al. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 2004;6(4):236-42.
182. Silva JM, Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Sanchez A, Rodriguez O, et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res.* 2001;7(9):2821-5.
183. Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, et al. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000;6(10):3823-6.
184. Chinnappa P, Taguba L, Arciaga R, Faiman C, Siperstein A, Mehta AE, et al. Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3705-9.
185. Dasí F, Martínez-Rodes P, March JA, Santamaría J, Martínez-Javaloyas JM, Gil M, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in the plasma of patients with prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1075:204-10.
186. March-Villalba JA, Martínez-Jabaloyas JM, Herrero MJ, Santamaría J, Aliño SF, Dasí F. Plasma hTERT mRNA discriminates between clinically localized and locally advanced disease and is a predictor of recurrence in prostate cancer patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12 Suppl 1:S69-77.
187. Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;945:172-8.
188. Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, et al. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7444-51.
189. Miura N, Nakamura H, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, et al. Clinical usefulness of serum telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA as a novel tumor marker for lung cancer. *Cancer Sci.* 2006;97(12):1366-73.

190. Miura N, Maruyama S, Oyama K, Horie Y, Kohno M, Noma E, et al. Development of a novel assay to quantify serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA and its significance as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 2007;72 Suppl 1:45-51.
191. Pucciarelli S, Rampazzo E, Briarava M, Maretto I, Agostini M, Digito M, et al. Telomere-specific reverse transcriptase (hTERT) and cell-free RNA in plasma as predictors of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(9):3089-96.
192. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002;48(10):1647-53.
193. Enache LS, Enache EL, Ramière C, Diaz O, Bancu L, Sin A, et al. Circulating RNA molecules as biomarkers in liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17644-66.
194. Wong SC, Ma BB, Lai PB, Ng SS, Lee JF, Hui EP, et al. The effect of centrifugation on circulating mRNA quantitation opens up a new scenario in expression profiling from patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Biochem*. 2007;40(16-17):1277-84.
195. Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, Markopoulos AK, Koudou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(6):580-9.
196. El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, Bigbee WL, Kirkwood JM, Luketich JD, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2004;50(3):564-73.
197. Giovannetti E, Erozeñci A, Smit J, Danesi R, Peters GJ. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;81(2):103-22.
198. Cekaite L, Eide PW, Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. MicroRNAs as growth regulators, their function and biomarker status in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(6):6476-505.
199. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5848-56.
200. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.
201. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375-81.
202. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2010;127(1):118-26.
203. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-92.
204. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1721-6.
205. Wang ZX, Bian HB, Wang JR, Cheng ZX, Wang KM, De W. Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2011;104(7):847-51.

206. Liu XG, Zhu WY, Huang YY, Ma LN, Zhou SQ, Wang YK, et al. High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Med Oncol*. 2012;29(2):618-26.
207. Roth C, Stückerath I, Pantel K, Izbicki JR, Tachezy M, Schwarzenbach H. Low levels of cell-free circulating miR-361-3p and miR-625* as blood-based markers for discriminating malignant from benign lung tumors. *PLoS One*. 2012;7(6):e38248.
208. Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol*. 2010;119(3):586-93.
209. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
210. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2281-90.
211. Yang H, Gu J, Wang KK, Zhang W, Xing J, Chen Z, et al. MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5744-52.
212. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(5):672-5.
213. Silva A, Bullock M, Calin G. The Clinical Relevance of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2015;7(4):2169-82.
214. Sorenson GD. A review of studies on the detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;906:13-6.
215. Vallée A, Marcq M, Bizieux A, Kouri CE, Lacroix H, Bennouna J, et al. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer*. 2013;82(2):373-4.
216. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem*. 2009;55(3):587-9.
217. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30.
218. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1075:299-307.
219. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem*. 2003;49(6 Pt 1):1028-9.
220. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EA, de Kok JB. Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem*. 2003;49(3):525-6.
221. Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY, Geiger S, Kremer A, Nagel D, et al. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem*. 2005;51(8):1544-6.
222. Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AL, Wainscoat JS. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1394-9.

223. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DM, Leszinski GS, Siegele B, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta*. 2011;412(23-24):2085-8.
224. Lam NY, Rainer TH, Chiu RW, Lo YM. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem*. 2004;50(1):256-7.
225. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1848-50.
226. Chan KC, Yeung SW, Lui WB, Rainer TH, Lo YM. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*. 2005;51(4):781-4.
227. De Mattos-Arruda L, Caldas C. Cell-free circulating tumour DNA as a liquid biopsy in breast cancer. *Mol Oncol*. 2016;10(3):464-74.
228. Fleischhacker M, Schmidt B. Cell-free DNA resuscitated for tumor testing. *Nat Med*. 2008;14(9):914-5.
229. Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 6):488-94.
230. Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol Proced Online*. 2013;15(1):5.
231. Ramachandran K, Speer CG, Fiddy S, Reis IM, Singal R. Free circulating DNA as a biomarker of prostate cancer: comparison of quantitation methods. *Anticancer Res*. 2013;33(10):4521-9.
232. Szpechcinski A, Struniawska R, Zaleska J, Chabowski M, Orlowski T, Roszkowski K, et al. Evaluation of fluorescence-based methods for total vs. amplifiable DNA quantification in plasma of lung cancer patients. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 6:675-81.
233. Czeiger D, Shaked G, Eini H, Vered I, Belochitski O, Avriel A, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(2):264-70.
234. Czeiger D, Agassi R, Sebbag G, Zlotnik A, Douvdevani A, Shaked G. [Plasma DNA measurement as a biomarker of cancer]. *Harefuah*. 2014;153(10):569-72, 625.
235. Chimingqi M, Moutereau S, Pernet P, Conti M, Barbu V, Lemant J, et al. Specific real-time PCR vs. fluorescent dyes for serum free DNA quantification. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(8):993-5.
236. Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, et al. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*. 2014;451:18-24.
237. Guadalajara H, Domínguez-Berzosa C, García-Arranz M, Herreros MD, Pascual I, Sanz-Baro R, et al. The concentration of deoxyribonucleic acid in plasma from 73 patients with colorectal cancer and apparent clinical correlations. *Cancer Detect Prev*. 2008;32(1):39-44.
238. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
239. Skrzypski M. Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: lung cancer perspective. *Lung Cancer*. 2008;59(2):147-54.
240. Murphy J, Bustin SA. Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;9(2):187-97.

241. Bar T, Kubista M, Tichopad A. Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(4):1395-406.
242. De Lellis L, Curia MC, Aceto GM, Toracchio S, Colucci G, Russo A, et al. Analysis of extended genomic rearrangements in oncological research. *Ann Oncol.* 2007;18 Suppl 6:vi173-8.
243. Andersen RF, Spindler KL, Brandslund I, Jakobsen A, Pallisgaard N. Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. *Clin Chim Acta.* 2015;439:97-101.
244. Fung KY, Nice E, Priebe I, Belobrajdic D, Phatak A, Purins L, et al. Colorectal cancer biomarkers: to be or not to be? Cautionary tales from a road well travelled. *World J Gastroenterol.* 2014;20(4):888-98.
245. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Clin Chem.* 2003;49(1):1-6.
246. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(16):1180-4.
247. Czeiger D, Shaked G, Sebbag G, Vakhrushev A, Flomboy A, Lior Y, et al. Elevated Cell-Free DNA Measured by a Simple Assay Is Associated With Increased Rate of Colorectal Cancer Relapse. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(6):852-7.
248. Agassi R, Czeiger D, Shaked G, Avriel A, Sheynin J, Lavrenkov K, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(1):18-24.
249. Garcia-Olmo DC, Garcia-Olmo D. Biological role of cell-free nucleic acids in cancer: the theory of genomestasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1-2):153-61.
250. Akman T, Oztop I, Baskin Y, Unek IT, Demir N, Ellidokuz H, et al. The association of clinicopathological features and survival in colorectal cancer patients with kras mutation status. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(1):96-102.
251. Rui YY, Zhang D, Zhou ZG, Wang C, Yang L, Yu YY, et al. Can K-ras gene mutation be utilized as prognostic biomarker for colorectal cancer patients receiving chemotherapy? A meta-analysis and systematic review. *PLoS One.* 2013;8(10):e77901.
252. Li W, Zhi W, Zou S, Qiu T, Ling Y, Shan L, et al. Distinct Clinicopathological Patterns of Mismatch Repair Status in Colorectal Cancer Stratified by KRAS Mutations. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128202.
253. Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, Weyler J, Wuyts W, Van Marck E, et al. KRAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis. *Br J Cancer.* 2010;103(10):1627-36.
254. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calò V, Valerio MR, Latteri MA, et al. Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 4:iv50-5.
255. Patil H, Korde R, Kapat A. KRAS gene mutations in correlation with clinicopathological features of colorectal carcinomas in Indian patient cohort. *Med Oncol.* 2013;30(3):617.
256. Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, Kuchiba A, Qian ZR, Liao X, et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Mol Cancer.* 2014;13:135.

257. Lin JK, Chang SC, Wang HS, Yang SH, Jiang JK, Chen WC, et al. Distinctive clinicopathological features of Ki-ras mutated colorectal cancers. *J Surg Oncol*. 2006;94(3):234-41.
258. Zahrani A, Kandil M, Badar T, Abdelsalam M, Al-Faiar A, Ismail A. Clinico-pathological study of K-ras mutations in colorectal tumors in Saudi Arabia. *Tumori*. 2014;100(1):75-9.
259. Navarro S, Pérez-Segura P, Ramón y Cajal S, Salazar R, García-Foncillas J, Musulén Palet E, et al. Recomendación para la determinación de biomarcadores en el carcinoma colorrectal. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Revista Española de Patología: Elsevier Doyma*; 2012. p. 130-44.
260. Yoon HH, Tougeron D, Shi Q, Alberts SR, Mahoney MR, Nelson GD, et al. KRAS codon 12 and 13 mutations in relation to disease-free survival in BRAF-wild-type stage III colon cancers from an adjuvant chemotherapy trial (N0147 alliance). *Clin Cancer Res*. 2014;20(11):3033-43.
261. Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(11):1193-7.
262. Baskin Y, Dagdeviren YK, Calibasi G, Canda AE, Sarioglu S, Ellidokuz H, et al. KRAS mutation profile differences between rectosigmoid localized adenocarcinomas and colon adenocarcinomas. *J Gastrointest Oncol*. 2014;5(4):265-9.
263. Li W, Qiu T, Zhi W, Shi S, Zou S, Ling Y, et al. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. *BMC Cancer*. 2015;15:340.
264. Kargozaran H, Kahlenberg M, Khatri VP. The implications of colorectal cancer molecular biology in clinical practice. *Surg Oncol Clin N Am*. 2008;17(2):341-55, viii-ix.
265. Lee DW, Kim KJ, Han SW, Lee HJ, Rhee YY, Bae JM, et al. KRAS mutation is associated with worse prognosis in stage III or high-risk stage II colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(1):187-94.
266. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):466-74.
267. Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(8):913-23.
268. Hernández-Losa J, Sanz J, Landolfi S, López-Ríos F, Palacios J, Bautista M, et al. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Revista Española de Patología: Elsevier Doyma*; 2012. p. 76-85.
269. van Helden EJ, Menke-van der Houven van Oordt CW, Heymans MW, Ket JCF, van den Oord R, Verheul HMW. Optimal use of anti-EGFR monoclonal antibodies for patients with advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Cancer Metastasis Rev*. 2017.
270. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2091-6.

271. Javle M, Hsueh CT. Updates in Gastrointestinal Oncology - insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology. *J Hematol Oncol.* 2009;2:9.
272. Margonis GA, Spolverato G, Kim Y, Karagkounis G, Choti MA, Pawlik TM. Effect of KRAS Mutation on Long-Term Outcomes of Patients Undergoing Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(13):4158-65.
273. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol.* 2002;13(9):1438-46.
274. Rui Y, Wang C, Zhou Z, Zhong X, Yu Y. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis. *Hepatogastroenterology.* 2015;62(137):19-24.
275. Zhong XY, von Mühlén I, Li Y, Kang A, Gupta AK, Tyndall A, et al. Increased concentrations of antibody-bound circulatory cell-free DNA in rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 2007;53(9):1609-14.
276. Gahan PB. Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer. *Infect Disord Drug Targets.* 2012;12(5):360-70.
277. Czeiger D, Dukhno O, Douvdevani A, Porat Y, Shimoni D, Fulga V, et al. Transient extremity ischemia augments CD34+ progenitor cell availability. *Stem Cell Rev.* 2011;7(3):639-45.
278. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, et al. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86(3):136-42.
279. Lim SH, Spring KJ, de Souza P, MacKenzie S, Bokey L. Circulating tumour cells and circulating nucleic acids as a measure of tumour dissemination in non-metastatic colorectal cancer surgery. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(3):309-14.
280. De Roock W, Biesmans B, De Schutter J, Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diagn Ther.* 2009;13(2):103-14.
281. Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst.* 2011;7(10):2848-54.
282. Patel KM, Tsui DW. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. *Clin Biochem.* 2015;48(15):957-61.
283. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007;318(5853):1108-13.
284. Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer--results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma. *Int J Cancer.* 2014;135(9):2215-22.
285. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1715-22.
286. Zhuang R, Li S, Li Q, Guo X, Shen F, Sun H, et al. The prognostic value of KRAS mutation by cell-free DNA in cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182562.
287. Qiu LX, Mao C, Zhang J, Zhu XD, Liao RY, Xue K, et al. Predictive and prognostic value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: a meta-analysis of 22 studies. *Eur J Cancer.* 2010;46(15):2781-7.

288. Gan S, Wilson K, Hollington P. Surveillance of patients following surgery with curative intent for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2007;13(28):3816-23.
289. Hundt S, Haug U, Brenner H. Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(10):1935-53.
290. Kim HJ, Yu MH, Kim H, Byun J, Lee C. Noninvasive molecular biomarkers for the detection of colorectal cancer. *BMB Rep*. 2008;41(10):685-92.
291. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Lamerz R. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2000;20(6D):5195-8.
292. Wang JY, Lu CY, Chu KS, Ma CJ, Wu DC, Tsai HL, et al. Prognostic significance of pre- and postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with colorectal cancer. *Eur Surg Res*. 2007;39(4):245-50.
293. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537-40.
294. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer*. 2013;133(2):346-56.
295. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ, Khan ZA, Araia R, Glover C, et al. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg*. 2002;235(2):226-31.
296. Lim SH, Becker TM, Chua W, Caixeiro NJ, Ng WL, Kienzle N, et al. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;346(1):24-33.
297. García-Olmo DC, Gutiérrez-González L, Samos J, Picazo MG, Atiénzar M, García-Olmo D. Surgery and hematogenous dissemination: comparison between the detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma before and after tumor resection in rats. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(8):1136-44.

ANEXOS

ANEXO 1: Se realizó un estudio para evaluar el valor pronóstico de la cuantificación del ADN total en el preoperatorio mediante las tres técnicas de laboratorio descritas. Los resultados obtenidos se reflejan en las siguientes tablas (Tablas A1-A15):

	ESTADO DE KRAS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO MUTADO MUTADO	47 15	3097,685 1237,359	10063,869 2227,211	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO MUTADO MUTADO	48 17	3,0634 7,7871	2,582 12,789	P=0,035
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO MUTADO MUTADO	40 12	34,675 42,671	16,464 16,884	N.S

Tabla A1: relación del ADN plasmático total con es estado de KRAS.

	LOCALIZACIÓN SIGMA VS RESTO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN FG/ML	RESTO COLON SIGMA	39 23	1977,992 3783,209	7322,745 11043,170	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	RESTO COLON SIGMA	39 26	3,708 5,185	3,969 10,213	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	RESTO COLON SIGMA	29 23	37,885 34,800	17,956 17,003	N.S

Tabla A2: relación del ADN plasmático total con la localización del tumor.

	ANTECEDENTE DE NEOPLASIA PREVIA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	55 7	2831,023 1206,429	9322,201 2843,074	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	58 7	4,431 3,206	7,457 2,276	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	46 6	35,626 43,376	17,458 17,178	N.S

Tabla A3: relación del ADN plasmático total con el antecedente de neoplasia previa.

	ESTADIO TUMORAL pT	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	TIS-I-II TIII-IV	10 52	126,570 3132,421	127,574 9591,481	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	TIS-I-II TIII-IV	11 54	4,544 4,249	3,074 7,666	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	TIS-I-II TIII-TIV	9 43	35,580 36,717	16,952 17,729	N.S

Tabla A4: relación del ADN plasmático total con el estadio tumoral pT.

	AFECTACIÓN GANGLIONAR pN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	pN- pN+	28 34	1868,059 3289,586	8240,495 9379,641	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	pN- pN+	29 36	3,347 5,066	2,882 9,150	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	pN- pN+	23 29	38,683 34,805	19,194 16,142	N.S

Tabla A5: relación del ADN plasmático total con la afectación ganglionar pN.

	METÁSTASIS AL DIAGNÓSTICO pM	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	50 12	2422,376 3586,067	8781,146 9421,080	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	52 13	3,176 8,791	2,507 14,611	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	40 12	36,049 38,091	16,379 21,339	N.S

Tabla A6: relación del ADN plasmático total con la presencia de metástasis pM.

	CARCINOMATOSIS PERITONEAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	59 3	2778,481 73,733	9046,669 79,684	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	61 4	4,431 2,282	7,292 0,836	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	48 4	37,056 30,098	17,419 18,886	N.S

Tabla A7: relación del ADN plasmático total con la presencia de carcinomatosis peritoneal.

	INVASIÓN PERINEURAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	37 25	3658,960 1150,803	11077,367 3268,546	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	39 26	3,653 5,268	3,921 10,169	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	29 23	38,239 34,354	19,962 13,749	N.S

Tabla A8: relación del ADN plasmático total con la presencia de invasión perineural.

	INVASIÓN LINFOVASCULAR	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	19 43	2582,092 2676,554	9962,643 8424,811	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	20 45	4,477 4,220	4,890 7,913	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	16 36	37,534 36,070	21,5567 15,593	N.S

Tabla A9: relación del ADN plasmático total con la presencia de invasión linfovascular.

	ESTADIO TNM	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	I-II III-IV	25 37	2078,488 3032,146	8715,678 9023,218	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	I-II III-IV	26 39	3,4912 4,837	2,964 8,829	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	I-II III-IV	20 32	40,243 34,194	16,728 17,728	N.S

Tabla A10: relación del ADN plasmático total con el estadio TNM.

	ESTADIO DUKES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	A-B C-D	26 36	1996,671 3117,726	8549,725 9136,002	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	A-B C-D	27 38	3,577 4,812	2,921 8,951	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	A-B C-D	19 33	39,866 34,594	18,712 16,651	N.S

Tabla A11: relación del ADN plasmático total con el estadio DUKES.

	DATOS DE PROGRESIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	46 16	3011,840 1600,433	9993,630 4081,196	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	48 17	3,390 6,865	2,780 12,980	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	36 16	35,496 38,826	16,272 20,200	N.S

Tabla A12: relación del ADN plasmático total con datos de progresión A.P y/o exitus tumoral.

	CARCINOMATOSIS PERITONEAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	57 3	4414,210 60,283	15660,102 52,596	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	61 4	7,137 2,030	15,962 2,364	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	48 4	44,942 34,513	24,883 14,472	N.S

Tabla A13: relación del ADN plasmático total con la presencia de carcinomatosis peritoneal.

	MORTALIDAD CÁNCER ESPECÍFICA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	57 5	2847,726 366,240	9197,731 696,103	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	59 6	4,506 2,257	7,402 1,022	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	45 7	35,820 41,021	17,162 19,946	N.S

Tabla A14: relación del ADN plasmático total con la mortalidad cáncer específica.

	MORTALIDAD TOTAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
--	------------------	---	-------	-------------------	---

ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN FG/ML	NO SÍ	58 4	2825,514 67,950	9118,383 103,736	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	61 4	4,350 3,519	7,304 1,471	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	48 4	37,007 30,686	17,767 13,238	N.S

Tabla A15: relación del ADN plasmático total con la mortalidad total.

ANEXO 2: se realizó posteriormente el mismo estudio para evaluar el valor pronóstico de la cuantificación del ADN total en el postoperatorio mediante las tres técnicas de laboratorio y diversas variables clínicopatológicas. Los resultados obtenidos se reflejan en las siguientes tablas (Tablas A16-A28).

	LOCALIZACIÓN SIGMA VS RECTO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	RESTO COLON SIGMA	37 23	4035,510 4455,522	17649,450 10809,909	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	RESTO COLON SIGMA	39 26	7,015 6,535	18,060 10,963	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	RESTO COLON SIGMA	29 23	46,772 40,820	26,147 21,880	N.S

Tabla A16: relación del ADN plasmático total con la localización del tumor.

	ANTECEDENTE DE NEOPLASIA PREVIA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	53 7	4249,754 3793,414	16137,845 6373,830	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	58 7	7,273 3,093	16,370 1,950	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	46 6	43,218 51,204	24,444 24,098	N.S

Tabla A17: relación del ADN plasmático total con el antecedente de neoplasia previa.

	ESTADIO TUMORAL pT	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	TIS-I-II TIII-IV	9 51	328,950 4879,026	338,609 16509,456	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	TIS-I-II TIII-IV	11 54	5,356 7,122	5,081 16,888	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	TIS-I-II TIII-TIV	9 43	35,580 36,717	16,952 17,729	N.S

Tabla A18: relación del ADN plasmático total con el estadio tumoral pT.

	AFECTACIÓN GANGLIONAR pN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	pN- pN+	27 33	1827,615 6134,704	6319,657 19743,299	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	pN- pN+	29 36	3,843 9,224	3,691 20,393	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	pN- pN+	23 29	46,6513 42,148	29,918 19,065	N.S

Tabla A19: relación del ADN plasmático total con la afectación ganglionar pN.

	AFECTACIÓN GANGLIONAR pM	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	48 12	3742,820 6011,292	15972,215 12605,031	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	52 13	6,868 6,643	16,990 7,533	N.S

ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO	40	44,703	24,472	N.S
	SÍ	12	42,262	24,714	

Tabla A20: relación del ADN plasmático total con la presencia de metástasis pM.

	INVASIÓN PERINEURAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR POSTCIRUGÍA EN PG/ML	NO	35	5730,084	19630,777	N.S
	SÍ	25	2049,516	4506,279	
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA POSTCIRUGÍA EN NG/ML	NO	39	7,387	18,110	N.S
	SÍ	26	5,977	10,784	
ADN PLASMÁTICO POR FLUORIMETRÍA POSTCIRUGÍA	NO	29	45,682	29,558	N.S
	SÍ	23	42,195	15,828	

Tabla A21: relación del ADN plasmático total con la presencia de invasión perineural.

	INVASIÓN LINFOVASCULAR	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR POSTCIRUGÍA EN PG/ML	NO	18	1986,058	7023,548	N.S
	SÍ	42	5143,852	17685,013	
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA POSTCIRUGÍA EN NG/ML	NO	20	4,332	4,733	N.S
	SÍ	45	7,930	18,339	
ADN PLASMÁTICO POR FLUORIMETRÍA POSTCIRUGÍA	NO	16	44,704	28,998	N.S
	SÍ	36	43,889	22,366	

Tabla A22: relación del ADN plasmático total con la presencia de invasión linfovascular.

	ESTADIO TNM	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	I-II	24	2078,085	6677,499	N.S
	III-IV	36	5608,800	18960,370	

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	I-II III-IV	26 39	3,948 8,740	3,835 19,652	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	I-II III-IV	20 32	47,907 41,785	25,415 23,689	N.S

Tabla A23: relación del ADN plasmático total con el estadio TNM.

	ESTADIO DUKES	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN FG/ML	A-B C-D	25 35	1997,358 5767,340	6549,360 19212,952	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	A-B C-D	27 38	3,910 8,893	3,767 19,892	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	A-B C-D	19 33	47,427 42,247	30,742 19,996	N.S

Tabla A24: relación del ADN plasmático total con el estadio DUKES.

	DATOS DE PROGRESIÓN	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	45 15	4799,149 2388,610	17439,565 4927,635	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	48 17	7,389 5,226	17,725 6,007	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	36 16	44,026 44,396	24,715 24,151	N.S

Tabla A25: relación del ADN plasmático total con datos de progresión A.P y/o exitus tumoral.

	ESTADO DE KRAS	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO MUTADO MUTADO	45 15	4523,752 3214,800	17392,666 5719,117	N.S

ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO MUTADO MUTADO	48 17	6,833 6,793	17,724 6,308	N.S
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO MUTADO MUTADO	40 12	42,632 49,166	22,701 29,599	N.S

Tabla A26: relación del ADN plasmático total con es estado de KRAS.

	MORTALIDAD CÁNCER ESPECÍFICA	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	55 5	4326,494 2766,740	15889,402 5972,966	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	59 6	7,341 1,732	16,201 1,170	P=0,019
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	45 7	43,783 46,435	24,413 25,374	N.S

Tabla A27: relación del ADN plasmático total con la mortalidad cáncer específica.

	MORTALIDAD TOTAL	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	P
ADN PLASMÁTICO POR PCR PRECIRUGÍA EN PG/ML	NO SÍ	51 9	4414,643 2960,450	16447,298 5540,148	N.S
ADN PLASMÁTICO POR ESPECTROFOTOMETRÍA PRECIRUGÍA EN NG/ML	NO SÍ	55 10	7,706 1,969	16,728 1,176	P=0,009
ADN PLASMÁTICO POR PCR FLUORIMETRÍA	NO SÍ	41 11	44,325 43,447	25,325 21,141	N.S

Tabla A28: relación del ADN plasmático total con la mortalidad total.